

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7398279号
(P7398279)

(45)発行日 令和5年12月14日(2023.12.14)

(24)登録日 令和5年12月6日(2023.12.6)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861 Z Z N A
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z
請求項の数 38 (全140頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2019-561957(P2019-561957)	(73)特許権者	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ ィ オブ カリフォルニア The Regents of the U niversity of Califo rnia
(86)(22)出願日	平成30年5月9日(2018.5.9)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2 番 フロア
(65)公表番号	特表2020-519269(P2020-519269 A)	(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(43)公表日	令和2年7月2日(2020.7.2)	(74)代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(86)国際出願番号	PCT/US2018/031913	(74)代理人	100104282
(87)国際公開番号	WO2018/208998		
(87)国際公開日	平成30年11月15日(2018.11.15)		
審査請求日	令和3年5月6日(2021.5.6)		
(31)優先権主張番号	62/504,497		
(32)優先日	平成29年5月10日(2017.5.10)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 C R I S P R / C A S 9 核送達による細胞RNAの狙いを定めた編集

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的RNAについて、C R I S P R / C a s による狙いを定めたRNA編集を行うための組み換え発現系であって、

(A) RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ1 (A D A R 1) またはRNAに作用するアデノシンデアミナーゼ2 (A D A R 2) の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼ (d C a s 9) を含むC R I S P R / C a s RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と

(B) 以下:

(i) 前記標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列であって、該短鎖延長配列は、長さ15ヌクレオチド~60ヌクレオチドであり、かつ、標的アデノシンについて mismatchesを含む、短鎖延長配列;

(ii) d C a s 9 スキャフォールド結合配列; および

(iii) 前記標的RNAに対して相同性の領域を含むスペーサー配列を含む延長されたシングルガイドRNA (e s g RNA) をコードする核酸配列であって、ここで、前記e s g RNA (i)、(ii)、および(iii)の配列は、前記e s g RNA内で3'から5'に向かって位置している、核酸配列とを含む、前記組み換え発現系。

【請求項2】

(A) および(B)が、少なくとも1つのベクター内に含まれ、前記少なくとも1つの

10

20

ベクターが、同一のベクターまたは異なるベクターでありえる、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 3】

前記 d C a s 9 が、A D A R 2 の触媒的に活性化デアミナーゼドメインに融合している、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 4】

前記 A D A R 2 の触媒的に活性化デアミナーゼドメインが、(1) ヒト A D A R 2 の野生型の触媒的に活性化デアミナーゼドメイン、または(2) 野生型ヒト A D A R 2 と比較して触媒活性が高まっているヒト A D A R 2 の触媒的に活性化デアミナーゼドメインの変異体である、請求項 3 に記載の組み換え発現系。

10

【請求項 5】

前記ヒト A D A R 2 の触媒的に活性化デアミナーゼドメインの変異体が、E 4 8 8 Q 変異を含む、請求項 4 に記載の組み換え発現系。

【請求項 6】

前記 d C a s 9 の N 末端ドメインが、A D A R 1 または A D A R 2 のいずれかの触媒的に活性化デアミナーゼドメインの C 末端に融合している、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 7】

前記 d C a s 9 が、リンカーを介して、A D A R 1 または A D A R 2 のいずれかの触媒的に活性化デアミナーゼドメインに融合している、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

20

【請求項 8】

前記リンカーが、半可動性の X T E N ペプチドリinkerである、請求項 7 に記載の組み換え発現系。

【請求項 9】

前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、3' 延長配列である、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 10】

前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、前記標的 R N A とほぼ完璧な R N A - R N A 塩基対形成する能力を有する相同性の領域を含む、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 11】

30

前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、前記標的 R N A 内のアデノシンについて第 2 のミスマッチをさらに含む、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 12】

前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、前記標的 R N A 内のアデノシンについて第 3 のミスマッチをさらに含む、請求項 11 に記載の組み換え発現系。

【請求項 13】

前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、前記標的 R N A 内のアデノシンについて第 4 のミスマッチをさらに含む、請求項 12 に記載の組み換え発現系。

【請求項 14】

前記 e s g R N A が、マーカー配列をさらに含む、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

40

【請求項 15】

前記 e s g R N A が、R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター配列をさらに含む、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 16】

前記 R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター配列が、U 6 プロモーター配列である、請求項 15 に記載の組み換え発現系。

【請求項 17】

前記 e s g R N A が、スペーサー配列とスキャフォールド配列の間にリンカー配列を含む、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 18】

50

P A M配列をコードする核酸をさらに含む、請求項 1 に記載の組み換え発現系。

【請求項 1 9】

前記少なくとも 1 つのベクターが、ウイルスペクターである、請求項 2 に記載の組み換え発現系。

【請求項 2 0】

前記ウイルスペクターが、アデノ随伴ウイルスペクター (A A V)、レンチウイルスペクター、またはアデノウイルスペクターである、請求項 1 9 に記載の組み換え発現系。

【請求項 2 1】

延長されたシングルガイド RNA (e s g RNA) をコードする核酸を含むベクターであって、前記 e s g RNA は、

(i) 標的 RNA に対して相同性の短鎖延長配列であって、該短鎖延長配列は、長さ 1 5 ヌクレオチド ~ 6 0 ヌクレオチドであり、かつ、標的アデノシンについてミスマッチを含む、短鎖延長配列と、

(i i) d C a s 9 スキャフォールド結合配列と、

(i i i) 前記標的 RNA に対して相補的なスペーサー配列と、

を含み、(i)、(i i)、および(i i i) が、前記 e s g RNA 内で 3 ' から 5 ' に向かって位置している、前記ベクター。

【請求項 2 2】

ウイルスペクターである、請求項 2 1 に記載のベクター。

【請求項 2 3】

前記ウイルスペクターが、アデノ随伴ウイルスペクター (A A V)、レンチウイルスペクター、またはアデノウイルスペクターである、請求項 2 2 に記載のベクター。

【請求項 2 4】

発現コントロール要素をさらに含む、請求項 2 1 に記載のベクター。

【請求項 2 5】

請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載のベクターを含むウイルス粒子。

【請求項 2 6】

請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の組み換え発現系を含む細胞。

【請求項 2 7】

(i) 標的 RNA に対して相同性の短鎖延長配列であって、該短鎖延長配列は、長さ 1 5 ヌクレオチド ~ 6 0 ヌクレオチドであり、かつ、標的アデノシンについてミスマッチを含む、短鎖延長配列と、

(i i) d C a s 9 スキャフォールド結合配列と、

(i i i) 前記標的 RNA に対して相同性の領域を含むスペーサー配列とを含む、延長されたシングルガイド RNA (e s g RNA) であって、ここで、前記 e s g RNA (i)、(i i)、および(i i i) の配列は、前記 e s g RNA 内で 3 ' から 5 ' に向かって位置している、e s g RNA 。

【請求項 2 8】

C R I S P R / C a s RNA 編集融合リボ核タンパク質複合体であって、

(A) A D A R 1 または A D A R 2 の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型 C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼ (d C a s 9) ; および

(B) 以下 :

(i) 標的 RNA に対して相同性の短鎖延長配列であって、該短鎖延長配列は、長さ 1 5 ヌクレオチド ~ 6 0 ヌクレオチドであり、かつ、標的アデノシンについてミスマッチを含む、短鎖延長配列と、

(i i) d C a s 9 スキャフォールド結合配列と、

(i i i) 前記標的 RNA に対して相同性の領域を含むスペーサー配列とを含む、延長されたシングルガイド RNA (e s g RNA) であって、ここで、前記 e s g RNA (i)、(i i)、および(i i i) の配列は、前記 e s g RNA 内で 3 ' から 5 ' に向かって位置している、e s g RNA

10

20

30

40

50

を含み、ここで、前記 d C a s 9 - A D A R 融合タンパク質は、前記 e s g R N A と接触して、R N A 編集リボ核タンパク質複合体を形成する、C R I S P R / C a s R N A 編集融合リボ核タンパク質複合体。

【請求項 29】

選択的 R N A 編集を行う i n v i t r o 方法であって、

請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の組み換え発現系を細胞に投与することを含む、方法。

【請求項 30】

2' O M e R N A と D N A 塩基の繰り返しを含むアンチセンス合成オリゴヌクレオチド化合物 (P A M m e r) を投与することをさらに含む、請求項 29 に記載の i n v i t r o 方法。

10

【請求項 31】

狙いを定めた細胞 R N A 編集がプロセッシングおよび動力学に及ぼす効果を特徴づける i n v i t r o 方法であって、

請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の組み換え発現系、請求項 21 から 24 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 25 に記載のウイルス粒子、または請求項 26 に記載の細胞をサンプルに対して投与すること、およびその効果を決定することを含む、方法。

【請求項 32】

前記サンプルが、対象に由来する、請求項 31 に記載の i n v i t r o 方法。

【請求項 33】

20

対象における疾患または状態を治療する方法において使用するための組成物であって、

請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の組み換え発現系、請求項 21 から 24 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 25 に記載のウイルス粒子、または請求項 26 に記載の細胞を含み、

前記組成物は、請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の組み換え発現系、請求項 21 から 24 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 25 に記載のウイルス粒子、または請求項 26 に記載の細胞を、対象または対象から単離されたサンプルに対して投与することを含む方法において使用される、組成物。

【請求項 34】

前記方法が、標的 R N A において、G から A への変異の修正をさらに含む、請求項 33 に記載の組成物。

30

【請求項 35】

前記疾患が、ハーラー症候群、嚢胞性線維症、筋ジストロフィー、脊髄損傷、脳卒中、外傷性脳損傷、聴覚消失 (ノイズへの過剰暴露または聴器毒性による)、多発性硬化症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、パーキンソン病、アルコール中毒症、アルコール離脱症候、過急速ベンゾジアゼピン離脱症候群、およびハンチントン病の群から選択される、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 36】

(A)

(i) 請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の組み換え発現系、

40

(i i) 請求項 21 から 24 のいずれか一項に記載のベクター、

(i i i) 請求項 25 に記載のウイルス粒子、

(i v) 請求項 26 に記載の細胞、

(v) 請求項 27 に記載の e s g R N A、および

(v i) 請求項 28 に記載の C R I S P R / C a s R N A 編集融合リボ核タンパク質複合体

のうちの 1 つまたは複数と、

(B) 使用説明書と

を含む、キット。

【請求項 37】

50

前記使用説明書が、パート(A)のうちの1つまたは複数、細胞、対象から単離されたサンプルまたは対象に投与することを含む方法に従うものである、請求項36に記載のキット。

【請求項38】

標的RNAについてCRISPR/Casによる狙いを定めたRNA編集を行うための組み換え発現系であって、以下：

(A) RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ1(ADAR1)またはRNAに作用するアデノシンデアミナーゼ2(ADAR2)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(dCas9)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列；および

(B) 以下：

(i) 前記標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列であって、該短鎖延長配列は、長さ15ヌクレオチド~60ヌクレオチドであり、かつ、標的アデノシンについてミスマッチを含む、短鎖延長配列と、

(ii) dCas9スキャフォールド結合配列と、

(iii) 前記標的RNAに対して相同性の領域を含むスペーサー配列とを含む、延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列であって、前記esgRNA(i)、(ii)および(iii)の配列は、前記esgRNAにおいて3'から5'に向かって位置している、核酸配列を含む、組み換え発現系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年5月10日出願の米国仮特許出願第62/504,497号明細書に対して、35U.S.C. § 119(e)に基づき付与された優先権を主張し、その内容は、参考として本明細書にそのまま組み込まれている。

【0002】

政府支援の記載

本発明は、国立衛生研究所により授与された助成番号第HG004659号および同第NS075449号に基づく政府支援を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

生細胞内のRNAを標的とし、それを操作することを目的とする本戦略は、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)または工学的に操作されたRNA結合タンパク質(RBP)の使用に主に立脚する。ASO療法には、病原性転写物の除去またはRBP結合の調節において高い将来性が認められるものの、その構築は合成的であり、したがってDNA内にコードされることは不可能である。これは、患者の生存期間全体を通じてASOを定期的に投与することに立脚する有望な遺伝子療法戦略を複雑にしている。さらに、同療法はRNAの遺伝子配列を調節することができない。RBP、例えばタンパク質のPumilioやFBF相同性ファミリー(PUF)等は、標的転写物を認識し、そしてRNA修飾エフェクターに融合して特異的認識および操作を可能にするように設計され得るものの、この種のコンストラクトに基づくプラットフォームは、標的毎に広範なタンパク質エンジニアリングを必要とし、また困難かつ高コストであることが証明され得る。

【0004】

RNAを直接編集するのに使用される現在のシステムは、コーディングが不可能なコンポーネント、例えばガイドRNAのエディターゼ部分(例えば、SNAPタグ)への化学的融合等、またはコーディングが可能なアプタマー結合部分(例えば、BoxBタンパク

10

20

30

40

50

質)の融合による比較的low親和性の繫留に立脚する。

【0005】

現在のCRISPR/Cas RNA標的システムは、シングルガイドRNA、任意選択的に2'OMe RNAおよびDNA塩基の繰り返しからなるオリゴヌクレオチド(PAMmer)を一般的に使用して、生細胞内の特定のRNA分子を標的とするための簡便迅速にプログラム可能なシステムを提供する。しかし、このようなシステムを改善および/または変更すれば、効率、特異性、および/またはオフターゲット編集イベントに関する諸問題に対処するのに役立つ可能性がある。本開示は、このような必要性に対処し、そして関連する長所を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示の要旨

したがって、有効かつ可逆的な操作、ならびに簡便性、信頼性、および汎用性のある標的RNAの調節を実現するための、完全にコーディング可能できわめて特異的なCRISPR/Casシステム、組成物、および方法が本明細書に提示される。

【0007】

いくつかの態様では、標的RNAについて、CRISPR/Casによる狙いを定めたRNA編集(CRISPR/Cas-directed RNA editing)を行うための組み換え発現系であって、(A)RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(nuclease-dead CRISPR associated endonuclease)(dCas)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と、(B)(i)標的アデノシンについて mismatchesを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、および(ii)dCasスキヤフォールド結合配列を含む延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列とを含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系が本明細書に提示される。いくつかの実施形態では、前記発現系は、標的配列について、CRISPR/Cas RNA-RNA塩基特異的アデノシンからイノシンへの(A-I)編集を行う能力を有するdCas-ADAR核タンパク質複合体を発現する。

【0008】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、esgRNAは、(iii)標的RNAに対して相同性の領域を含むスペーサー配列をさらに含む。

【0009】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、(A)および(B)は、同一のベクター内に含まれる、または異なるベクター内に含まれる。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスペクターである。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、ウイルスペクターは、アデノ随伴ウイルスペクター(AAV)、レンチウイルスペクター、またはアデノウイルスペクターである。

【0010】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、ADARは、ADAR1、ADAR2、およびADAR3からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ADARの触媒的に活性なデアミナーゼドメインは、ADAR2の触媒的に活性なデアミナーゼドメインである。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、ADAR2の触媒的に活性なデアミナーゼドメインは、(1)ヒトADAR2の野生型触媒的に活性なデアミナーゼドメイン、または(2)野生型ヒトADAR2と比較して触媒活性が高まっているヒトADAR2の触媒的に活性なデアミナーゼドメインの変異体(mutant human catalytically active deaminase domain of ADAR2)である。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、ヒトADAR2の触媒的に活性なデアミナーゼドメインの変異体は、E488Q変異を含む。

【0011】

10

20

30

40

50

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、d C a s は、ヌクレアーゼ不活性型 C a s 9 (d C a s 9) である。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、d C a s 9 の N 末端ドメインは、A D A R の触媒的に活性なデアミナーゼドメインの C 末端に融合している。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、d C a s は、リンカーを介して A D A R の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合している。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、リンカーは、半可動性の (semi-flexible) X T E N ペプチドリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、G S G S リンカーである。

【 0 0 1 2 】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A の短鎖延長配列は、3 ' 延長配列である。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A の短鎖延長配列は、標的配列とほぼ完璧な R N A - R N A 塩基対形成する能力を有する相同性の領域を含む。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A の短鎖延長配列は、標的 R N A 内のアデノシンについて第 2 のミスマッチをさらに含む。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A の短鎖延長配列は、標的 R N A 内のアデノシンについて第 3 のミスマッチ、および任意選択的に標的 R N A 内のアデノシンについて第 4 のミスマッチをさらに含む。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A の短鎖延長配列は、長さ約 1 5 ヌクレオチド ~ 約 6 0 ヌクレオチドである。

【 0 0 1 3 】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A は、マーカー配列をさらに含む。

【 0 0 1 4 】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A は、R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター配列をさらに含む。組み換え発現系のいくつかの実施形態では、R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター配列は、U 6 プロモーター配列である。

【 0 0 1 5 】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A は、スペーサー配列とスキャフォールド配列の間にリンカー配列を含む。

【 0 0 1 6 】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、e s g R N A (i) 、 (i i) 、および (i i i) の配列は、e s g R N A 内で 3 ' から 5 ' に向かって位置している。

【 0 0 1 7 】

組み換え発現系のいくつかの実施形態では、発現系は、P A M 配列をコードする核酸をさらに含む。

【 0 0 1 8 】

いくつかの態様では、延長されたシングルガイド R N A (e s g R N A) をコードする核酸を含む、それからなる、または実質的になるベクターであって、(i) 標的アデノシンについてミスマッチを含む標的 R N A に対して相同性の短鎖延長配列と、(i i) d C a s スキャフォールド結合配列と、(i i i) 標的配列に対して相補的な配列 (スペーサー配列) とを含み、(i) 、(i i) 、および (i i i) が、e s g R N A 内で 3 ' から 5 ' に向かって位置しているベクターが、本明細書に提示される。

【 0 0 1 9 】

ベクターのいくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。ベクターのいくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクター (A A V) 、レンチウイルスベクター、またはアデノウイルスベクターである。ベクターのいくつかの実施形態では、ベクターは、発現コントロール要素 (expression control element) をさらに含む。

【 0 0 2 0 】

いくつかの態様では、(i) 標的アデノシンについてミスマッチを含む標的 R N A に対して相同性の短鎖延長配列と、(i i) d C a s スキャフォールド結合配列と、(i i i) 標的配列に対して相補的な配列 (スペーサー配列) とを含む延長されたシングルガイド

10

20

30

40

50

RNA (esgRNA) をコードする核酸を含む、それからなる、または実質的になるベクターを含むウイルス粒子であって、(i)、(ii)、および(iii)が、esgRNAにおいて3'から5'に向かって位置しているウイルス粒子が本明細書に提示される。いくつかの実施形態では、(A)RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(dCas)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と、(B)(i)標的アデノシンについてミスマッチを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、および(ii)dCasスキヤフォールド結合配列を含む延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列とを含む、1つまたは複数のベクターを含むウイルス粒子が本明細書に提示される。

10

【0021】

いくつかの態様では、(i)標的アデノシンについてミスマッチを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列と、(ii)dCasスキヤフォールド結合配列と、(iii)標的配列に対して相補的な配列(スペーサー配列)とを含む、延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸を含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系、ウイルス粒子、および/またはベクターを含む細胞であって、(i)、(ii)、および(iii)が、esgRNAにおいて3'から5'に向かって位置している細胞が本明細書に提示される。いくつかの実施形態では、(A)RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(dCas)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と、(B)(i)標的アデノシンについてミスマッチを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、および(ii)dCasスキヤフォールド結合配列を含む延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列とを含む、1つまたは複数のウイルス粒子、組み換え発現系、および/またはベクターを含む細胞が本明細書に提示される。

20

【0022】

(i)標的アデノシンについてミスマッチを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、(ii)dCasスキヤフォールド結合配列、および(iii)標的配列に対して相補的な配列(スペーサー配列)を含む延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸を含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系、ウイルス粒子、および/またはベクターのうちの任意の1つを細胞に対して投与することを含む、それからなる、または実質的になる選択的RNA編集を行う方法であって、(i)、(ii)、および(iii)が、esgRNAにおいて3'から5'に向かって位置している方法についても本明細書に提示される。いくつかの実施形態では、方法は、2'OMe RNAとDNA塩基の繰返しを含むアンチセンス合成オリゴヌクレオチド化合物(PAMmer)を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、in vitro法またはin vivo法である。いくつかの実施形態では、(A)RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(dCas)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と、(B)(i)標的アデノシンについてミスマッチを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、および(ii)dCasスキヤフォールド結合配列を含む、延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列とを含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系、ウイルス粒子、および/またはベクターのうちの任意の1つを投与することを含む、それからなる、または実質的になる選択的RNA編集を行う方法が、本明細書に提示される。

30

40

【0023】

(i)標的アデノシンについてミスマッチを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、(ii)dCasスキヤフォールド結合配列、および(iii)標的配列に対して相補的な配列(スペーサー配列)を含む、延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)

50

A) をコードする核酸を含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系、ウイルス粒子、および/またはベクターのうちの任意の1つをサンプルに対して投与すること、およびその効果を決定することを含む、狙いを定めた細胞RNA編集(directed cellular RNA editing)がプロセシングおよび動力学に及ぼす効果の特徴づける方法であって、(i)、(ii)、および(iii)が、esgRNAにおいて3'から5'に向かって位置している前記方法についても、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、サンプルは対象に由来する。いくつかの実施形態では、方法は、in vitro法またはin vivo法である。いくつかの実施形態では、(A)RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(dCas)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と、(B)(i)標的アデノシンについて mismatchesを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、および(ii)dCasスキフォールド結合配列を含む延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列とを含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系、ウイルス粒子、および/またはベクターのうちの任意の1つをサンプルに対して投与すること、およびその効果を決定することを含む、狙いを定めた細胞RNA編集がプロセシングおよび動力学に及ぼす効果の特徴づける方法が、本明細書に提示される。

【0024】

その他の態様では、(i)標的アデノシンについて mismatchesを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、(ii)dCasスキフォールド結合配列、および(iii)標的配列に対して相補的な配列(スペーサー配列)を含む延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸を含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系、ウイルス粒子、および/またはベクターのうちの任意の1つを、対象または対象から単離されたサンプルに対して投与することを含む、対象における疾患または状態を治療する方法であって、(i)、(ii)、および(iii)が、esgRNAにおいて3'から5'に向かって位置している方法が本明細書に提示される。いくつかの実施形態では、(A)RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(dCas)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と、(B)(i)標的アデノシンについて mismatchesを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、および(ii)dCasスキフォールド結合配列を含む延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列とを含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系、ウイルス粒子、および/またはベクターのうちの任意の1つを対象または対象から単離されたサンプルに対して投与することを含む、対象における疾患または状態を治療する方法が本明細書に提示される。

【0025】

いくつかの実施形態では、方法は、標的RNAにおけるGからAへの変異をさらに修正する。いくつかの実施形態では、疾患は、ハーラー症候群、嚢胞性線維症、デュシェンヌ筋ジストロフィー、脊髄損傷、脳卒中、外傷性脳損傷、聴覚消失(ノイズへの過剰暴露または聴器毒性による)、多発性硬化症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、アルコール中毒症、アルコール離脱症候群、過急速ベンゾジアゼピン離脱症候群、およびハンチントン病の群から選択される。

【0026】

その他の態様では、(A)RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(dCas)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と、(B)(i)標的アデノシンについて mismatchesを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、および(ii)dCasスキフォールド結合配列を含む、延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列とを含む、それからなる、または実質的になる組み換え発現系、ウイルス粒子、および/または

ベクターのうちの1つまたは複数と、使用説明書とを含む、それからなる、またはそれからなるキットが本明細書に提示される。いくつかの実施形態では、説明書は、本明細書に記載される方法のいずれか1つに基づき使用される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1A~1Dは、組み換え発現系の実施形態およびそれに関するデータについて非限定的に例証する図である。図1Aは、(i)様々な疾患、例えばがんや神経変性などを引き起こすおそれのある様々なRNAの編集について、生細胞を対象としたCREDITのコンセプト、および(ii)dCas9-デアミナーゼ融合体がガイドRNAに結合すると、標的アデノシン近傍のガイド延長部のハイブリダイゼーションを誘発して、二本鎖RNA(dsRNA)A-I塩基特異的編集標的を生成することを示す図である。特に、図1Bは、XTENリンカーによりヒトADAR2(ADAR2)のデアミナーゼドメイン(DD)に融合した、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)Cas9タンパク質から構成されるCREDIT組み換え発現系、および3'短鎖RNA延長部(esgRNA)を有するシングルガイドRNA(sgRNA)を示す図である。図1Cの蛍光画像データは、図1Bの組み換え発現系は、脱アミノを誘発する3'延長部を有する標的デュアルガイドRNAを必要とし、またeGFPレポーター転写物からの発現において、未成熟終止コドン(PTC)により媒介される発現停止を回復させることができることを示す図である。図1Dは、標的ガイドおよび非標的ガイドにより誘発された、RCas9との野生型デアミナーゼ融合体、ハイパー活性デアミナーゼ融合体を利用する組み換え発現系のFACS定量化を示す図である。

10

20

【図2】図2は、AAVに基づくベクター系として、代表的な組み換え発現系について非限定的に例証する図である。AAV系は、AAVピリオンとしてパッケージされるADARデアミナーゼドメイン/Cas9エンドヌクレアーゼ融合タンパク質をコードする核酸配列と延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)とを担持するベクターを含む。

【図3】図3は、pcDNA3.1(1)__ADAR2__XTEN__dCas9(配列番号27)のマップについて例証する図である。CMVエンハンサーは、位置235~614(長さ380bp)に位置し、哺乳動物細胞において組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。CMVプロモーターは、位置615~818(長さ204bp)に位置し、哺乳動物細胞における組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。ADAR2触媒ドメインは、961~2100(長さ1140bp)に位置し、ヒトADAR2(ADAR2)の触媒的に活性な脱アミノ化ドメインをコードする。XTENは、位置2101~2148(長さ48bp)に位置し、組み換えタンパク質ドメインを結びつけるペプチドリンカーをコードする。dCas9は、位置2149~6252(長さ4104bp)に位置し、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)由来の、触媒的に不活性化な(D10AおよびH841A)CRISPR-Cas9タンパク質をコードする。HAは、位置6256~6282(長さ27bp)に位置し、ヒトインフルエンザヘマグルチニン(HA)エピトプタグをコードする。2XSV40NLSは、位置6301~6348(長さ48bp)に位置し、シミアンウイルス40(SV40)大型T抗原に由来する核局在化シグナル(NLS)をコードする。bGHポリ(A)シグナルは、位置6426~6650(長さ225bp)に位置し、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアダニル化シグナルをコードする。

30

40

【図4】図4は、pcDNA3.1(1)__ADAR2__XTEN__コントロール(配列番号28)のマップについて例証する図である。CMVエンハンサーは、位置235~614(長さ380bp)に位置し、哺乳動物細胞における組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。CMVプロモーターは、位置615~818(長さ204bp)に位置し、哺乳動物細胞における組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。ADAR2触媒ドメインは、位置961~2100(長さ1140bp)に位置し、ヒトADAR2の触媒的に活性な脱アミノ化ドメイン(ADAR2)をコードする。XTENは、位置2101~2148(48bp)に位置し、組み換えタンパク質ドメインを結びつけるペプチ

50

ドリンカーをコードする。HAは、位置2152~2178(27bp)に位置し、ヒトインフルエンザヘマグルチニン(HA)エピトープタグをコードする。2X SV40 NLSは、位置2197~2244(48bp)に位置する、シミアンウイルス40(SV40)大型T抗原に由来する核局在化シグナル(NLS)である。bGHポリ(A)シグナルは、位置2322~2546(225bp)に位置し、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアデニル化シグナルをコードする。

【図5】図5は、pcDNA3.1__ADAR2(E488Q)__XTEN__dCas9(配列番号29)のマップについて例証する図である。CMVエンハンサーは、位置235~614(380bp)に位置し、哺乳動物細胞において組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。CMVプロモーターは、位置615~818(204bp)に位置し、哺乳動物細胞において組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。ADARB1(E488Q)触媒ドメインは、位置961~2100(1140bp)に位置し、活性過多の点変異(E488Q)を含む、ヒトADAR2の触媒的に活性な脱アミノ化ドメイン(ADARB1)をコードする。XTENは、位置2101~2148(48bp)に位置し、組み換えタンパク質ドメインを結びつけるペプチドリンカーをコードする。dCas9は、位置2149~6252(4104bp)に位置し、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)由来の触媒的に不活性な(D10AおよびH841A)CRISPR-Cas9タンパク質をコードする。HAは、位置6256~6282(27bp)に位置し、ヒトインフルエンザヘマグルチニン(HA)エピトープタグをコードする。2X SV40 NLSは、位置6301~6348(48bp)に位置し、シミアンウイルス40(SV40)大型T抗原bGHに由来する核局在化シグナル(NLS)をコードする。ポリ(A)シグナルは、位置6426~6650(225bp)に位置し、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアデニル化シグナルをコードする。

【図6】図6は、pcDNA3.1__ADAR2(E488Q)__XTEN__コントロール(配列番号30)のマップについて例証する図である。CMVエンハンサーは、位置235~614(380bp)に位置し、哺乳動物細胞において組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。CMVプロモーターは、位置615~818(204bp)に位置し、哺乳動物細胞において組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。ADARB1(E488Q)触媒ドメインは、位置961~2100(1140bp)に位置し、活性過多の点変異(E488Q)を含む、ヒトADAR2の触媒的に活性な脱アミノ化ドメイン(ADARB1)をコードする。XTENは、位置2101~2148(48bp)に位置し、組み換えタンパク質ドメインを結びつけるペプチドリンカーをコードする。HAは、位置2152~2178(27bp)に位置し、ヒトインフルエンザヘマグルチニン(HA)エピトープタグをコードする。2X SV40 NLSは、位置2197~2244(48bp)に位置し、シミアンウイルス40(SV40)大型T抗原に由来する核局在化シグナル(NLS)をコードする。bGHポリ(A)シグナルは、位置2322~2546(225bp)に位置し、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアデニル化シグナルをコードする。

【図7】図7は、50bp__GFP__mCherry__延長部(配列番号31)のマップについて例証する図である。U6プロモーターは、位置4555~4817(263bp)に位置し、哺乳動物細胞においてsgRNAの発現を駆動するPol IIIプロモーターである。EGFP標的スペーサーは、位置4818~4838(21bp)に位置し、相補的なEGFPレポーターmRNAを標的とするsgRNAのスペーサー配列をコードする。sgRNAスキファールドは、位置4839~4924(86bp)に位置し、(F+E)修飾を含む、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)CRISPR-Cas9システム用のsgRNAスキファールドをコードする(Chen et al. 2014)。リンカーは、位置4925~4930(6bp)に位置し、sgRNAスキファールドを延長配列に架橋するリンカー配列をコードする。またEGFP延長部は、位置4931~4951(21bp)に位置し、標的部位と塩基対形成するRNA延長配列をコードし、そしてA-Cミスマッチを使用してAからIへの編集を促進する。s

10

20

30

40

50

gRNA スキャフォールド終止部位は、位置 1 ~ 7 (7 b p) に位置し、P o l I I I RNA 合成を終了させるポリ (T) 配列を含む。E f 1 a プロモーターは、位置 2 1 ~ 5 6 6 (5 4 6 b p) に位置し、哺乳動物細胞においてタンパク質の発現を駆動する構成型プロモーターである。m C h e r r y は、位置 5 7 2 ~ 1 2 8 2 (7 1 1 b p) に位置し、D s R e d 蛍光タンパク質の単量体誘導体をコードする。b G H ポリ (A) シグナルは、位置 1 3 3 0 ~ 1 5 5 4 (2 2 5 b p) に位置し、ウシ成長ホルモン (b G H) ポリアデニル化シグナルをコードする。

【図 8】図 8 は、スペーサーレス __ G F P m C h e r r y __ 延長部 (配列番号 3 2) のマップについて例証する図である。U 6 プロモーターは、位置 7 5 7 ~ 1 0 1 9 (2 6 3 b p) に位置し、哺乳動物細胞において s g RNA の発現を駆動する P o l I I I プロモーターである。s g RNA スキャフォールドは、位置 1 0 2 0 ~ 1 1 0 5 (8 6 b p) に位置し、(F + E) 修飾を含むストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) C R I S P R - C a s 9 システム用の s g RNA スキャフォールドをコードする (Chen et al. 2014)。リンカーは、位置 1 1 0 6 ~ 1 1 1 1 (6 b p) に位置し、s g RNA スキャフォールドを延長配列に架橋するリンカー配列を含む。E G F P 延長部は、位置 1 1 1 2 ~ 1 1 3 2 (2 1 b p) に位置し、標的部位と塩基対形成する RNA 延長配列をコードし、そして A - C ミスマッチを使用して A から I への編集を促進する。s g RNA スキャフォールド終止部は、位置 1 1 3 3 ~ 1 1 3 9 (7 b p) に位置し、P o l I I I RNA 合成を終了させるポリ (T) 配列を含む。E f 1 a プロモーターは、位置 1 1 5 3 ~ 1 6 9 8 (5 4 6 b p) に位置し、哺乳動物細胞においてタンパク質の発現を駆動する構成型プロモーターである。m C h e r r y は、位置 1 7 0 4 ~ 2 4 1 4 (7 1 1 b p) に位置し、D s R e d 蛍光タンパク質の単量体誘導体をコードする。b G H ポリ (A) シグナルは、位置 2 4 6 2 ~ 2 6 8 6 (2 2 5 b p) に位置し、ウシ成長ホルモン (b G H) ポリアデニル化シグナルをコードする。

【図 9】図 9 は、G F P __ n o __ s p a c e r __ r e v c o m p __ m C h e r r y __ ギブソン (配列番号 3 3) のマップについて例証する図である。U 6 プロモーターは、位置 4 5 5 5 ~ 4 8 1 7 (2 6 3 b p) に位置し、また哺乳動物細胞において s g RNA の発現を駆動する P o l I I I プロモーターである。s g RNA スキャフォールドは、位置 4 8 1 8 ~ 4 9 0 3 (8 6 b p) に位置し、(F + E) 修飾を含むストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) C R I S P R - C a s 9 システム用の s g RNA スキャフォールドをコードする (Chen et al. 2014)。リンカーは、位置 4 9 0 4 ~ 4 9 0 9 (6 b p) に位置し、s g RNA スキャフォールドを延長配列に架橋するリンカー配列をコードする。E G F P r e v c o m p 延長部は、位置 4 9 1 0 ~ 4 9 3 0 (2 1 b p) に位置し、E G F P mRNA 標的部位の配列とマッチングする RNA 逆相補性延長配列をコードする。s g RNA スキャフォールド終止部位は、位置 1 ~ 7 (7 b p) に位置し、P o l I I I RNA 合成を終了させるポリ (T) 配列を含む。E f 1 a プロモーターは、位置 2 1 ~ 5 6 6 (5 4 6 b p) に位置し、哺乳動物細胞においてタンパク質の発現を駆動する構成型プロモーターである。m C h e r r y は、位置 5 7 2 ~ 1 2 8 2 (7 1 1 b p) に位置し、D s R e d 蛍光タンパク質の単量体誘導体をコードする。b G H ポリ (A) シグナルは、位置 1 3 3 0 ~ 1 5 5 4 (2 2 5 b p) に位置し、ウシ成長ホルモン (b G H) ポリアデニル化シグナルをコードする。

【図 10】図 10 は、p B l u e s c r i p t I I S K + U 6 - ラムダ 2 - s g RNA (F + E) (配列番号 3 4) のマップについて例証する図である。U 6 プロモーターは、位置 7 5 7 ~ 1 0 1 9 (2 6 3 b p) に位置し、哺乳動物細胞において s g RNA の発現を駆動する P o l I I I プロモーターである。ラムダ 2 ガイド RNA は、位置 1 0 2 0 ~ 1 0 3 9 (2 0 b p) に位置し、ラムダファージ 2 を標的とする非標的 s g RNA 配列をコードする。s g RNA スキャフォールドは、位置 1 0 4 1 ~ 1 1 3 2 (9 2 b p) に位置し、(F + E) 修飾を含むストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) C R I S P R - C a s 9 システム用の s g RNA スキャフォールドをコードする (Chen et al. 2014)。

10

20

30

40

50

【図11】図11は、EGFP__スペーサーレス__SaCas9__sgRNA(配列番号47)のマップについて例証する図である。U6プロモーターは、位置4555~4817(263bp)に位置し、哺乳動物細胞においてsgRNAの発現を駆動するPolIIIプロモーターである。Sa sgRNAスキファールドは、位置4819~4894(76bp)に位置し、A-U塩基フリップを含む黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)CRISPR-Cas9システム用のsgRNAスキファールドをコードする(Chen et al. 2016)。リンカーは、位置4895~4900(6bp)に位置し、sgRNAスキファールドを延長配列に架橋するリンカー配列をコードする。EGFP延長部は、位置4901~4921(21bp)に位置し、標的部位と塩基対形成するRNA延長配列をコードし、A-C mismatchesを使用してAからIへの編集を促進する。sgRNAスキファールド終止部位は、位置1~7(7bp)に位置し、pol III RNA合成を終了させるポリ(T)配列を含む。Efl1aプロモーターは、位置21~566(546bp)に位置し、哺乳動物細胞においてタンパク質の発現を駆動する構成型プロモーターである。mCherryは、位置572~1282(711bp)に位置し、DsRed蛍光タンパク質の単量体誘導体をコードする。bGHポリ(A)シグナルは、位置1330~1554(225bp)に位置し、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアダニル化シグナルをコードする。

10

【図12】図12は、ADAR2__E488Q__dSaCas9__pCDNA3__1(配列番号48)のマップについて例証する図である。CMVエンハンサーは、位置235~614(380bp)に位置し、哺乳動物細胞において組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。CMVプロモーターは、位置615~818(204bp)に位置し、哺乳動物細胞において組み換えタンパク質の構成的発現を駆動する。ADAR B1触媒ドメインは、位置961~2100(1140bp)に位置し、ヒトADAR2の触媒的に活性な脱アミノ化ドメイン(ADAR B1)をコードする。GSリンカーは、位置2101~2112(12bp)に位置し、タンパク質ドメインを架橋するためのグリシン-セリンペプチドリナーをコードする。dSaCas9は、位置2113~5268(3156bp)に位置し、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)由来の触媒的に不活性化な(点変異D10AおよびN580Aを含む)CRISPR-Cas9タンパク質をコードする。HAは、位置5272~5298(27bp)に位置し、ヒトインフルエンザヘマグルチニン(HA)エピトプタグをコードする。2X SV40 NLSは、位置5317~5364(48bp)に位置し、シミアンウイルス40(SV40)大型T抗原に由来する核局在化シグナル(NLS)である。bGHポリ(A)シグナルは、位置5442~5666(225bp)に位置し、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアダニル化シグナルをコードする。

20

30

【図13-1】図13A~13Bは、S.ピオゲネス(S. pyogenes)に由来するヌクレアーゼ不活性型Cas9を含む組み換え発現系(dSpCas9)と黄色ブドウ球菌(S. aureus)に由来するヌクレアーゼ不活性型Cas9(dSaCas9)の間の比較について例証する図である。dSaCas9は、dSpCas9より有意に小さく、ウイルスにパッケージングする際に効率性を提供する。図13Aは、XTENリンカーを含むADAR2(E488Q)-dSpCas9融合コンストラクト(Sp-CREDITv1)の例証図、およびGS GSリンカーを含むADAR2(E488Q)-dSaCas9融合コンストラクト(Sa-CREDITv1)の例証図を示す。図13Bは、Sp-CREDITv1の有効性をSa-CREDITv1の有効性と比較する実験の結果を示す。このデータは、両CREDITシステムによるGFPLレポーターの編集の成功例を示し、Sa-CREDITv1の方が編集細胞について最高頻度を示す。

40

【図13-2】図13A~13Bは、S.ピオゲネス(S. pyogenes)に由来するヌクレアーゼ不活性型Cas9を含む組み換え発現系(dSpCas9)と黄色ブドウ球菌(S. aureus)に由来するヌクレアーゼ不活性型Cas9(dSaCas9)の間の比較について例証する図である。dSaCas9は、dSpCas9より有意に小さく、ウイルスにパッケージングする際に効率性を提供する。図13Aは、XTENリンカーを含むADAR

50

R2(E488Q)-dSpCas9融合コンストラクト(Sp-CREDITv1)の例証図、およびGSGSリンカーを含むADAR2(E488Q)-dSaCas9融合コンストラクト(Sa-CREDITv1)の例証図を示す。図1Bは、Sp-CREDITv1の有効性をSa-CREDITv1の有効性と比較する実験の結果を示す。このデータは、両CREDITシステムによるGFPLレポーターの編集の成功例を示し、Sa-CREDITv1の方が編集細胞について最高頻度を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

詳細な説明

本開示に基づく実施形態は、以下でより十分に記載される。ただし、本開示の態様は、異なる形態で具体化され得るものであり、本明細書に記載する実施形態に限定されるものと解釈すべきでない。むしろ、これらの実施形態は、本開示が網羅的かつ完全であるように、また当業者に本発明の範囲を十分に伝達するように提供される。本明細書における説明で使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的に限定され、制限するように意図されない。

10

【0029】

別途定義されなければ、本明細書で使用されるすべての用語(技術的用語および科学的用語を含む)は、本発明が属する当業者により理解される意味と同一の意味を一般的に有する。用語、例えば一般的に使用される辞書で定義される用語等は、本出願および関連する技術の文脈における意味と整合する意味を有するものと解釈すべきであり、また本明細書においてそのように明示的に定義されない限り、理想的または過度に形式的な意味合いで解釈すべきでないものとさらに理解される。下記で明示的に定義されないものの、そのような用語はその一般的な意味に基づき解釈されるべきである。

20

【0030】

本明細書における説明で使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的に限定され、本発明を制限するように意図されない。本明細書に記載されるすべての公開資料、特許出願、特許、およびその他の参考資料は、参考としてそのまま組み込まれている。

【0031】

本技術の実践では、別途明示されない限り、当技術分野の技能に含まれる、組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組み換えDNAの従来技術が採用される。

30

【0032】

文脈が別途示唆しない限り、本明細書に記載する本発明の様々な特性は、任意の組み合わせで使用可能であることが特に意図されている。さらに、本開示は、いくつかの実施形態において、本明細書に記載する任意の特性または特性の組み合わせは、除外または省略可能であることについても検討する。例証するならば、複合物がコンポーネントA、B、およびCを含むことを本明細書が記載する場合、A、B、もしくはCのいずれかまたはその組み合わせは、ことさらにまたは任意の組み合わせで省略および否定され得ることが特に意図されている。

【0033】

別途明示されない限り、すべての特定された実施形態、特性、および用語には、列挙された実施形態、特性、または用語と、その生物学的等価物の両方が含まれるように意図されている。

40

【0034】

すべての数字表示、例えばpH、温度、時間、濃度、および分子量は、その範囲を含め、該当する場合には1.0または0.1の増加分だけ、あるいは±15%、あるいは10%、あるいは5%、あるいは2%の変動分だけ増減する近似値である。必ずしも明示されないが、すべての数字表示には、用語「約」が先行するものと理解される。必ずしも明示されないが、本明細書に記載される試薬は単なる例示であるものと、そしてそのような試薬の等価物が当技術分野において公知であるものとやはり理解される。

50

【 0 0 3 5 】

定義

本発明の説明、および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、「the」は、文脈が別途明示しない限り、複数形もやはり含むように意図されている。

【 0 0 3 6 】

用語「約」は、本明細書で使用する場合、測定可能な数値、例えば量または濃度等を参照するとき、所定量の20%、10%、5%、1%、0.5%の変動、または0.1%の変動さえも含むように意図されている。

【 0 0 3 7 】

用語「許容される」、または「有効な」、または「十分な」は、本明細書で開示される任意のコンポーネント、範囲、用量形態等の選択を記載するのに使用されるとき、前記コンポーネント、範囲、用量形態等が開示される目的に適することが意図されている。

【 0 0 3 8 】

「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド」は、本明細書において交換可能に使用される場合、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAが含まれる。ポリヌクレオチドまたはヌクレオチド配列は二本鎖または一本鎖であり得る。ポリヌクレオチドまたはヌクレオチド配列が一本鎖であるとき、2つの相補鎖のいずれかを指し得る。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、改変されたヌクレオチドもしくは塩基、および/またはその類似物、あるいはDNAまたはRNAポリメラーゼによりポリマーに組み込み可能である任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、改変されたヌクレオチド、例えばメチル化されたヌクレオチドおよびその類似物等を含み得る。存在する場合には、ヌクレオチド構造に対する改変は、ポリマーのアセンブリの前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチドコンポーネントにより中断され得る。ポリヌクレオチドは、重合後に、例えばラベリングコンポーネントとのコンジュゲーション等によりさらに改変され得る。その他の種類の改変として、例えば、「caps」、天然に存在するヌクレオチドにおける、そのうちの1つまたは複数の類似体との置換、ヌクレオチド間修飾、例えば無電荷結合（メチルホスホン酸、リン酸トリエステル、ホスホアミデート、カバメート等）を含むもの、および有電荷結合（例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）を含むもの、例えば、タンパク質（ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジン等）のペンダント部分を含有するもの、インターカレーター（アクリジン、ソラレン等）を含むもの、キレート剤（金属、放射性金属、ホウ素、酸化性金属等）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、改変された結合（アノメリック核酸等）を含むもの等、ならびにポリヌクレオチド（複数可）の非修飾形態が挙げられる。さらに、糖中に通常存在するヒドロキシル基のいずれも、例えば、ホスホナート基、ホスフェート基により置換され、標準的な保護基により保護され、もしくは追加のヌクレオチドとの追加の結合に備えるために活性化され得る、または固体支持体にコンジュゲートし得る。5'末端および3'末端OHは、リン酸化され得る、またはアミンもしくは1~20個の炭素原子からなる有機キャッピング基部分と置換され得る。その他のヒドロキシルも、標準的な保護基に誘導体化され得る。ポリヌクレオチドは、リボースまたはデオキシリボース糖について、例えば、2'-O-メチル-2'-O-アシル、2'-フルオロ-または2'-アジド-リボース、炭素環式の糖類似物、アノマー糖、エピマー糖（例えばアラビノース、キシロース、またはリキソース等）、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式の類似物、および無塩基ヌクレオシド類似物（例えばメチルリボシド等）を含む、当技術分野において一般的に公知の類似の形態も含有し得る。1つまたは複数のホスホジエステル結合が、代替的結合基に置換し得る。この代替的結合基として、ホスフェートが、P(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂（「ホルムアセタル」）により置換されている実施形態であって、ただし各RまたはR'が、独立にH、または任意選択的にエーテル(-O-)結合を含有

10

20

30

40

50

する置換されたもしくは置換されていないアルキル（1～20C）、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラジルである実施形態が挙げられるが、ただしこれに限定されない。ポリヌクレオチド内のすべての結合が同一である必要はない。これまでの説明は、RNAおよびDNAを含め、本明細書で参照されるすべてのポリヌクレオチドに適用される。

【0039】

「オリゴヌクレオチド」とは、本明細書で使用する場合、長さ約200ヌクレオチド未満が一般的であるが、ただし必ずしもそうではない、一般的に一本鎖、一般的に合成の短鎖ポリヌクレオチドを一般的に指す。用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は相互に排他的ではない。ポリヌクレオチドについての上記説明は、オリゴヌクレオチドと同じように全面的に適用される。

10

【0040】

「核酸」、「核酸分子」、または「核酸配列」は、本明細書ではポリヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチドを指すのに交換可能に使用される。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチドと交換可能に使用される。

【0041】

本明細書で使用する場合、「実質的に相補的、または実質的に一致した」とは、2つの核酸配列が少なくとも90%の配列同一性を有することを意味する。好ましくは、2つの核酸配列は、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。あるいは、「実質的に相補的、または実質的に一致した」とは、2つの核酸配列が、高度に厳密な条件（複数可）の下でハイブリダイズすることができることを意味する。

20

【0042】

本明細書で使用する場合、「～を改善する」とは、少なくとも約1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、35%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、225%、250%、275%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%もしくはそれ超の、または列挙されている数値の任意の間の任意の数値の変化を意味する。あるいは、「～を改善する」とは、少なくとも約1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、500倍、1000倍、2000倍もしくはそれ超の、または列挙されている数値の任意の間の任意の数値の変化を意味し得る。

30

【0043】

本明細書で使用する場合、「ヌクレアーゼ型」または「ヌクレアーゼ不活性型」とは、ヌクレアーゼ活性が低下している、エンドもしくはエキソ-DNAse活性もしくはRNAse活性が低下している、ニッカーゼ活性が低下している、またはDNAおよび/もしくはRNAを開裂させる能力が低下しているポリペプチドを意味し得る。ヌクレアーゼ不活性型であるCas関連エンドヌクレアーゼの非限定的な例はとして、RuvCおよび/またはHNHヌクレアーゼドメインを不活性にする変異を有するエンドヌクレアーゼが挙げられる。例えば、S.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas9は、標的DNAまたはRNAを開裂させることができないヌクレアーゼ不活性型Cas9分子を引き起こす点変異D10AおよびH840Aにより不活性となり得る。dCas9分子は、gRNA標的配列に基づき標的RNAに結合する能力を保持する。

40

【0044】

本明細書で使用する場合、「ヌクレアーゼ活性の低下」とは、ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、DNAse、またはRNAse活性における、少なくとも約1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、35%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%もしくはそれ

50

超の、または列挙されている数値の任意の間の任意の数値の減衰を意味する。あるいは、「ヌクレアーゼ活性の低下」とは、少なくとも約1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、500倍、1000倍、2000倍もしくはそれ超の、または列挙されている数値の任意の間の任意の数値の逆数倍の減衰を意味し得る。

【0045】

本明細書で使用する場合、「触媒活性の上昇」とは、触媒活性、例えばデアミナーゼ活性において、対応する野生型触媒活性（例えば、野生型デアミナーゼ活性）と比較したときに、少なくとも約1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、35%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%もしくはそれ超の、または列挙されている数値の任意の間の任意の数値の増加を意味する。あるいは、「触媒活性の上昇」とは、対応する野生型触媒活性（例えば、野生型デアミナーゼ活性）と比較して、少なくとも約1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、500倍、1000倍、2000倍もしくはそれ超の、または列挙されている数値の任意の間の任意の数値の増加を意味し得る。

10

【0046】

本明細書で使用する場合、用語「ADAR」とは、AからIへの編集と呼ばれる、二本鎖RNA(dsRNA)においてアデノシンからイノシンへの加水分解式の脱アミノ化を触媒する、二本鎖RNA特異的アデノシンデアミナーゼを指し、RNAに作用するアデノシンデアミナーゼとしても知られている。このタンパク質の非限定的な代表的配列およびそのドメインの注解は、UniProt参照番号P55265(ヒト)およびQ99MU3(マウス)に見出される。

20

【0047】

用語「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」とは、本明細書で使用する場合、この名称と関連するウイルスのクラスのメンバーを指し、そしてパルボウイルス科(parvoviridae)ディペンドパルボウイルス属(dependoparvovirus)に属する。このウイルスの複数の血清型が遺伝子送達に適することが公知であり、すべての公知の血清型が、様々な組織型に由来する細胞に感染することができる。連続して番号付けされた少なくとも11個が先行技術に開示されている。本明細書に開示される方法において有用で非限定的な代表的血清型として、11個の血清型のうちのいずれか、例えばAAV2およびAAV8が挙げられる。

30

【0048】

やはり本明細書で使用する場合、「および/または」とは、関連する列挙された項目のうちの一つまたは複数のあらゆるすべての可能な組み合わせ、ならびにもう一方の(「または」)で解釈されるときには、組み合わせの欠如を意味し、それを含む。

【0049】

用語「アプタマー」とは、本明細書で使用する場合、1つまたは複数の選択された標的と高い親和性および特異性を有して結合することができる一本鎖DNAまたはRNA分子を意味する。非限定的な代表的標的として、タンパク質またはペプチドが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

40

【0050】

用語「Cas関連」とは、CRISPR(規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列)関連エンドヌクレアーゼを指す。「Cas9」は、この名称(UniProtKB G3ECR1(CAS9_STRTR))により名付けられたCas関連エンドヌクレアーゼである。不活性型Cas9または「dCas9」は、エンドヌクレアーゼおよび/または切断活性を欠くまたは実質的に欠くCas9エンドヌクレアーゼである。dCas9の非限定的な例は、AddGeneデータベースを通じて市販されているAddGeneプラスミド#74710内でコードされるdCas9である。

50

【 0 0 5 1 】

用語「細胞」とは、本明細書で使用する場合、任意選択的に対象または市販供給元から得られる原核細胞または真核細胞を意味し得る。

【 0 0 5 2 】

用語「gRNA」または「ガイドRNA」とは、本明細書で使用する場合、CRISPR技術を利用する修正において、特定の遺伝子を標的とするのに使用されるガイドRNA配列を指す。標的特異性を目的としてgRNAおよびドナー治療用ポリヌクレオチドを設計する技術は当技術分野において周知されている。例えば、本明細書において参考として組み込まれているDoench, J., et al. Nature biotechnology 2014;32(12): 1262-7、およびGraham, D., et al. Genome Biol. 2015; 16: 260。

10

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用する場合、用語「CRISPR」とは、RNA干渉とは異なり、転写レベルにおいて遺伝子発現を制御する、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列経路に立脚する配列特異的遺伝子操作技術を指す。用語「gRNA」または「ガイドRNA」とは、本明細書で使用する場合、CRISPR技術を利用する修正において、特定の遺伝子を標的とするのに使用されるガイドRNA配列を指す。標的特異性を目的としてgRNAおよびドナー治療用ポリヌクレオチドを設計する技術は当技術分野において周知されている。例えば、Doench, J., et al. Nature biotechnology 2014;32(12): 1262-7、およびGraham, D., et al. Genome Biol. 2015; 16: 260。「シングルガイドRNA」または「sgRNA」は、Cas9と結合して複合体を活性化させ、必要なストランド切断を生み出すtracrRNA(トランス活性化RNA)と、tracrRNAに対して相補的なヌクレオチドを含むcrRNA(CRISPR RNA)とを単一のRNAコンストラクトに複合体化させる特別な種類のgRNAである。本明細書に記載されるように、「延長されたシングルガイドRNA」または「esgRNA」は、A-Cミスマッチが標的転写物との間に形成され、膨らんだアデノシン残基において編集される「偽dsRNA」基質を生成するように、編集対象となる標的RNAの標的アデノシンについてミスマッチを含む標的RNAに対して相同性の延長配列を含む特別な種類のsgRNAである。

20

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用する場合、用語「～を含むこと(comprising)」は、組成物および方法には列挙した要素が含まれるが、しかしその他を除外しないことを意味するように意図されている。本明細書で使用する場合、移行句「～から実質的になる」(および文法的変形形態)では、列挙した実施形態の列挙した物質またはステップ、および「基本的で新規の特徴(複数可)に顕著に影響を及ぼさない物質またはステップ」を包含するものと解釈される。In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976)(原本にて強調されている)を参照; MPEP § 2111.03も参照。したがって、用語「～から実質的になる(essentially consisting of)」は、本明細書で使用する場合、「～を含むこと(comprising)」と同等と解釈してはならない。「～からなる(consisting of)」は、その他の配合物の微量要素および本明細書で開示される組成物を投与するための実質的な方法ステップを超える部分の排除を意味するものとする。これらの移行用語のそれぞれにより定義される側面は、本開示の範囲内にある。

30

40

【 0 0 5 5 】

用語「～をコードする」とは、核酸配列に適用されるとき、ポリヌクレオチドであって、その天然の状態において、または当業者にとって周知の方法により操作されたときに、転写および/または翻訳されて、ポリペプチドおよび/またはその断片に対応するmRNAを生成することができるならば、ポリペプチド「をコードする」と言えるポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補体であり、コーディング配列がそれから推測され得る。

【 0 0 5 6 】

用語「同等」または「生物学的同等」は、特定の分子、生体物質または細胞物質を指す

50

場合、交換可能に使用され、そして最低限の相同性を有する一方、望ましい構造または機能をなおも維持するものを意図する。

【0057】

本明細書で使用する場合、用語「発現」とは、ポリヌクレオチドが mRNA に転写されるプロセス、および/または転写された mRNA が、その後ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノム DNA に由来する場合には、発現は、真核細胞内における mRNA のスプライシングを含み得る。遺伝子の発現レベルは、細胞または組織サンプル内で mRNA またはタンパク質の量を測定することにより決定され得る；さらに、特定のサンプルについて発現プロファイルを立証するために、複数の遺伝子の発現レベルが決定されることもあり得る。

10

【0058】

本明細書で使用する場合、用語「サンプル」とは、標的を含む組成物を指し得る。開示される方法、デバイス、およびシステムにより分析するための好適なサンプルとして、細胞、組織、臓器、もしくは生物、または細胞、組織、もしくは生物から得られる組成物が挙げられる。いくつかの実施形態では、サンプルは対象から単離される。

【0059】

本明細書で使用する場合、用語「機能的」は、特別な所定の効果を実現することを意図して、任意の分子、生体物質または細胞物質を修飾するのに使用され得る。

【0060】

「遺伝子送達媒体」は、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞に運ぶことができる任意の分子として定義される。遺伝子送達媒体の例は、リポソーム、ミセル、生体適合性ポリマー（天然ポリマーおよび合成ポリマーを含む）；リポタンパク質；ポリペプチド；多糖類；リポ多糖類；人工的なウイルスエンベロープ；金属粒子；および細菌またはウイルス（例えばバキュロウイルス、アデノウイルス、およびレトロウイルス等）、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクター、ならびに様々な真核生物宿主および原核生物宿主内での発現についてすでに記載されており、また遺伝子療法その他、単純なタンパク質発現に使用され得る、当技術分野で一般的に使用されるその他の組み換え媒体である。

20

【0061】

本明細書で開示されるポリヌクレオチドは、遺伝子送達媒体を使用して細胞または組織に送達され得る。「遺伝子送達」、「遺伝子移入」、「形質導入」等は、本明細書で使用する場合、導入で使用される方法の如何を問わず、外因性のポリヌクレオチド（「導入遺伝子」と時に呼ばれる）の宿主細胞への導入を指す用語である。そのような方法には、様々な周知技術、例えばベクター媒介式の遺伝子移入（例えば、ウイルスの感染/トランスフェクション、または様々なその他のタンパク質に基づくまたは脂質に基づく遺伝子送達複合体による）、ならびに「ネイキッド」ポリヌクレオチドの送達を促進する技術等（例えばエレクトロポレーション、「遺伝子銃」送達、およびポリヌクレオチドの導入で 사용되는様々なその他の技術等）が含まれる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞内に安定的または一時的に維持され得る。安定に維持するには、導入されるポリヌクレオチドが宿主細胞に適合する複製開始点を含むこと、またはその複製開始点が宿主細胞のレプリコン、例えば染色体外レプリコン（例えば、プラスミド）、または核染色体もしくはミトコンドリア染色体等に組み込まれていることが一般的に必要である。当技術分野において公知であり、また本明細書に記載されるように、いくつかの「ベクター」が、遺伝子の哺乳動物細胞への移送を媒介する能力を有することが公知である。

30

40

【0062】

「プラスミド」は、染色体 DNA とは独立的に複製する能力を有する、染色体 DNA から分離した染色体外 DNA 分子である。多くの場合、プラスミドは、環状および二本鎖である。プラスミドは、病原菌集団内で遺伝子水平伝播するための機構を提供し、また所与の環境状態において選択的長所を一般的に提供する。プラスミドは、競合的な環境のニッチにおいて天然に存在する抗生物質に対する耐性を提供する遺伝子を担持し得る、あるいは

50

は生成したタンパク質が類似した状況下で毒素として作用し得る。

【0063】

遺伝子工学で使用される「プラスミド」は、「プラスミドベクター」と呼ばれる。多くのプラスミドが、そのような用途のために市販されている。複製される遺伝子はプラスミドのコピーに挿入されるが、同プラスミドは、特定の抗生物質に対して細胞を耐性にする遺伝子、およびいくつかの一般的に使用される制限部位を含有する短鎖領域であり、この場所においてDNA断片の容易な挿入を可能にする複数のクローニング部位（MCSまたはポリリンカー）を含有する。プラスミドの別の主要な用途は、大量のタンパク質を作成することである。この場合、研究者は、対象とする遺伝子を内包するプラスミドを含有する細菌を増殖させる。バクテリアがその抗生物質耐性を付与するタンパク質を産生するのと全く同様に、挿入された遺伝子から大量のタンパク質を産生するように、やはり誘発可能である。

10

【0064】

「酵母菌人工的染色体」または「YAC」とは、大型のDNA断片（100kbよりも大きく、最大3000kb）をクローニングするために使用されるベクターを指す。それは、人工的に構築された染色体であり、酵母菌細胞における複製および保存に必要とされるテロメア配列、セントロメア配列、および複製起点配列を含有する。最初に環状プラスミドを使用して構築されるが、制限酵素を使用することにより直鎖状となり、次にDNAリガーゼが、付着末端を使用することにより直鎖状分子内に対象とする配列または遺伝子を付加することができる。酵母菌はそれ自体が真核細胞であり、翻訳後修飾を有する真核生物タンパク質生成物を得ることができるので、酵母菌発現ベクター、例えばYAC、YIp（プラスミドを組み込んだ酵母菌）やYEp（酵母菌エピソーマルプラスミド）等は極めて有用であるが、ただしYACは、BACよりも不安定であり、キメラ効果を生成することが判明している。

20

【0065】

「ウイルスベクター」は、*in vivo*、*ex vivo*、または*in vitro*で宿主細胞内に送達されるポリヌクレオチドを含む、組み換えにより生成されるウイルスまたはウイルス粒子として定義される。

【0066】

ウイルスベクターの例として、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクター等が挙げられる。感染性タバコモザイクウイルス（TMV）に基づくベクターは、タンパク質を製造するのに使用可能であり、そしてタバコ葉内でグリフィスシンを発現することが報告されている（O'Keefe et al. (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106(15):6099-6104）。アルファウイルスベクター、例えばセムリキ森林ウイルス（Semliki Forest virus）に基づくベクターおよびシンドビスウイルス（Sindbis virus）に基づくベクター等も、遺伝子療法および免疫療法で使用されるために開発された。Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439、およびYing et al. (1999) Nat. Med. 5(7):823-827を参照。遺伝子移入がレトロウイルスベクターにより媒介される態様では、ベクターコンストラクトとは、レトロウイルスゲノムまたはその一部、および治療遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。遺伝子移入で使用される現代のベクター法に関するさらなる詳細は、例えば、Kotterman et al. (2015) Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook Annual Review of Biomedical Engineering 17.に見出され得る。

30

40

【0067】

本明細書で使用する場合、「レトロウイルス媒介式の遺伝子移入」または「レトロウイルス形質導入」は同一の意味を帯び、またウイルスが細胞に進入し、そして宿主細胞ゲノム内にそのゲノムを組み込むことによって、遺伝子または核酸配列が宿主細胞に安定的に移されるプロセスを指す。ウイルスは、その通常の感染機構により宿主細胞に進入することができ、またはウイルスが異なる宿主細胞表面受容体またはリガンドと結合して細胞に進入するように、それを改変することができる。本明細書で使用する場合、レトロウイル

50

スペクターとは、ウイルスまたはウイルス様の進入機構を通じて、外因性の核酸を細胞に導入することができるウイルス粒子を指す。

【0068】

レトロウイルスは、RNAの形態でその遺伝情報を担持する；ただし、ウイルスが細胞に感染すると、RNAは、DNAの形態に逆転写され、感染した細胞のゲノムDNA内に組み込まれる。組み込まれたDNA形態は、プロウイルスと呼ばれる。

【0069】

遺伝子移入がDNAウイルスベクター、例えばアデノウイルス(Ad)またはアデノ随伴ウイルス(AAV)等により媒介される態様では、ベクターコンストラクトとは、ウイルスゲノムまたはその一部、および導入遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。アデノウイルス(Ad)は、比較的十分に特徴づけられているウイルスの均質な群であり、50を超える血清型を含む。Adは宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。組み換えAd由来のベクター、特に野生型ウイルスの組み換えおよび生成の可能性を低下させるベクターも構築されている。そのようなベクターが、供給業者、例えばTakara Bio USA社(Mountain View, CA)、Vector Biolabs社(Philadelphia, PA)、およびCreative Biogene社(Shirley, NY)等から市販されている。野生型AAVは、宿主細胞のゲノムへの組み込みにおいて高い感染性と特異性を有する。Wold and Toth (2013) Curr. Gene. Ther. 13(6):421-433, Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470, およびLebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996を参照。

【0070】

プロモーター、およびポリヌクレオチドが作動的に連結することができるクロニング部位の両方を含有するベクターは、当技術分野において周知されている。そのようなベクターは、in vitroまたはin vivoでRNAを転写する能力を有し、供給業者、例えばAgilent Technologies社(Santa Clara, Calif.)やPromega Biotech社(Madison, Wis.)等から市販されている。発現および/またはin vitroでの転写を最適化するためには、クロンの5'および/または3'非翻訳部分を除去、付加、または変更して、転写もしくは翻訳のレベルにおいて発現を妨害もしくは低減し得る余分の不適切な選択的翻訳開始コドンまたはその他の配列の可能性を取り除くことが必要となり得る。あるいは、コンセンサスリボソーム結合部位が、発現を増強するために開始コドンの5'側直近に挿入され得る。

【0071】

遺伝子送達媒体として、DNA/リボソーム複合体、ミセル、および標的ウイルスタンパク質-DNA複合体も挙げられる。標的抗体またはその断片も含むリボソームは、本明細書に開示する方法において使用可能である。ポリヌクレオチドの細胞または細胞集団への送達に付加して、本明細書に記載されるタンパク質を細胞または細胞集団に直接導入することが、タンパク質トランスフェクションの非限定的な技術により実施可能であるが、あるいは発現を増強することができ、および/または本明細書で開示されるタンパク質の活性を向上させることができる培養条件が、その他の非限定的な技術に該当する。

【0072】

「相同性」または「同一性」または「類似性」とは、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較目的でアライメントされ得る各配列内の位置を比較することにより決定可能である。比較される配列内の位置が同一の塩基またはアミノ酸により占められるとき、分子は、その位置において相同である。配列間の相同性の程度は、配列に共通するマッチングまたは相同的位置の数の関数である。「無関連」の配列または「非相同的」配列では、本開示の配列のうちの1つと共有される同一性は40%未満、あるいは25%未満である。

【0073】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、厳密な条件下でハイブリダイズする2つの核酸分子を指す場合もある。

10

20

30

40

50

【0074】

「ハイブリダイゼーション」とは、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間水素結合により安定化している複合体を形成する反応を指す。水素結合はワトソン・クリック塩基対形成、フーグステイン (Hoogsteen) 結合により、または任意のその他の配列特異的な方式で生じ得る。複合体は、二本鎖構造を形成する2本のストランド、マルチストランド複合体を形成する3本もしくはそれ超のストランド、単一の自己ハイブリダイジングストランド、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より多岐にわたるプロセスにおいて、PCR反応の開始、またはリポザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断等のステップを構成し得る。

【0075】

厳密なハイブリダイゼーション条件の例として、約25～約37のインキュベーション温度；約6×SSC～約10×SSCのハイブリダイゼーションバッファー濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約4×SSC～約8×SSCの洗浄溶液が挙げられる。中程度ハイブリダイゼーション条件の例として、約40～約50のインキュベーション温度；約9×SSC～約2×SSCのバッファー濃度；約30%～約50%のホルムアミド濃度；および約5×SSC～約2×SSCの洗浄溶液が挙げられる。高度に厳密な条件の例として、約55～約68のインキュベーション温度；約1×SSC～約0.1×SSCのバッファー濃度；約55%～約75%のホルムアミド濃度；および約1×SSC、0.1×SSC、または脱イオン水の洗浄溶液が挙げられる。一般的に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は、5分～24時間であり、1、2、もしくはそれ超の洗浄ステップを伴い、および洗浄インキュベーション時間は、約1、2、または15分である。SSCは、0.15MのNaClおよび15mMのクエン酸バッファーである。その他のバッファー系を使用するSSCの等価物も採用可能であるものと理解される。

【0076】

本明細書で使用する場合、用語「特異的に結合する」とは、特異的に結合する対の結合特異性を指す。潜在する他の標的の存在下でも、特定の標的ポリヌクレオチド配列の標的的特異的核酸配列によりハイブリダイズすることは、そのような結合の1つの特徴である。特異的結合は、2つの異なる核酸分子と関係し、化学的または物理的手段を通じて、核酸分子の1つが第2の核酸分子と特異的にハイブリダイズする。2つの核酸分子は、それらが相互に結合する場合、類似した特徴を有するその他のアッセイ構成成分からその結合パートナーを識別する能力を有する、という意味合いで関連している。結合コンポーネントの対の各メンバーは、リガンドおよび受容体(アンチリガンド)、特異的結合対(SBP)メンバーおよびSBPパートナー等と呼ばれる。

【0077】

用語「単離された」とは、本明細書で使用する場合、その他の物質を実質的に含まない分子または生物学的製剤または細胞物質を意味する。

【0078】

本明細書で使用する場合、用語「リンカー」とは、2つのタンパク質ドメインの間に存在し得る短鎖ペプチド配列を指す。リンカーは、多くの場合、可動性のアミノ酸残基、例えばグリシンまたはセリンを含み得、隣接しているが融合しているタンパク質ドメインの自由な動きを可能にする。「XTEN」とは、Schellenberger et al. (2009) Nat Biotechnol. 27: 1186-1190. doi: 10.1038/nbt.1588に提示される代表的なリンカーまたはその等価なバリエーションのうちの任意の1つを指す。

【0079】

本明細書で使用する場合、用語「臓器」は、個々の生物の特定部分に該当する構造であり、そこでは個々の生物のある1つの機能または複数の機能が局所的に実施され、また形態学的に分離している。臓器の非限定的な例として、皮膚、血管、角膜、胸腺、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、甲状腺、および脳が挙げられる。

【0080】

10

20

30

40

50

用語「フォトスペーサー隣接モチーフ」または「PAM」とは、Cas9のヌクレアーゼドメインを活性化させる配列を指す。「PAMmer」とは、PAM提示オリゴヌクレオチドを指す。本明細書で使用する場合、用語PAMmerとは、CRISPR/Cas9システムを最適化し、そして非標的RNAとの間で、またはゲノムDNAに対して交差反応することなく、RNA標的の特異的切断を生成することができる2'OMe RNAとDNA塩基の繰り返し(alternating 2'OMe RNA and DNA bases)から構成されるアンチセンス合成オリゴヌクレオチドおよび/またはPAM提示オリゴヌクレオチドのその他の変形体を一般的に指す。例えば、O'Connell et al. (2014) Nature. 516(7530):263-266を参照。

【0081】

用語「プロモーター」とは、本明細書で使用する場合、遺伝子等のコーディング配列の発現を制御する任意の配列を指す。プロモーターは、例えば、構成的、誘導可能、抑制可能、または組織特異的であり得る。「プロモーター」は、転写の開始および速度がコントロールされるポリヌクレオチド配列の領域に該当するコントロール配列である。プロモーターは、制御タンパク質および分子が結合し得る遺伝的要素、例えばRNAポリメラーゼおよびその他の転写因子等を含み得る。非限定的な代表的プロモーターとして、CMVプロモーターおよびU6プロモーターが挙げられる。

【0082】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」は交換可能に使用され、そしてその広義の意味合いにおいては、アミノ酸、アミノ酸類似物、またはペプチド模倣物の2つもしくはそれ超のサブユニットからなる化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合により連結し得る。別の態様では、サブユニットは、その他の結合、例えばエステル結合、エーテル結合等により連結し得る。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含みなければならず、またタンパク質の配列またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸の最大数について制限は設けられない。タンパク質およびペプチドは、末端アミノ酸上に未結合のカルボキシ基を備えた末端部を意味するC末端、および末端アミノ酸上に未結合のアミン基を備えた末端部を意味するN末端を有することが公知である。本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」とは、グリシン、およびDおよびL光学異性体の両方、アミノ酸類似物、およびペプチド模倣物を含む、天然アミノ酸および/または非天然もしくは合成アミノ酸を指す。用語「融合した」とは、タンパク質またはポリペプチドの文脈において、2つもしくはそれ超のタンパク質またはポリペプチド(またはそのドメイン)の末端間において融合タンパク質を形成する結合を指す。

【0083】

本明細書で使用する場合、用語「組み換え発現系」とは、組み換えにより形成された特定の遺伝物質またはタンパク質を発現させるための遺伝子コンストラクトを指す。

【0084】

本明細書で使用する場合、用語「対象」は、「患者」と交換可能に使用され、また任意の動物を意味するように意図されている。いくつかの実施形態では、対象は哺乳動物であり得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒト以外の哺乳動物である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、ネコ、イヌ、類人猿、ラット、またはヒトである。

【0085】

用語「組織」は、生きているもしくは死んだ生物の組織、または生きているもしくは死んだ生物に由来する、またはそれを模倣するように設計された任意の組織を指すのに、本明細書において使用される。組織は、健康である場合もあれば、疾患を有する場合もあり、および/または遺伝子変異を有する場合もある。生物学的組織は、任意の単一の組織(例えば、相互に連結し得る細胞の集合)、あるいは臓器または生物の身体の一部もしくは領域を構成する組織の群を含み得る。組織は均質な細胞物質を含み得る、あるいは複合構造、例えば胸部(例えば肺組織を含み得る)、骨組織、および/または筋肉組織を含む、身体のいくつかの領域に見出される構造等であり得る。代表的な組織として、肝臓、肺、

10

20

30

40

50

甲状腺、皮膚、膵臓、血管、膀胱、腎臓、脳、胆樹、十二指腸、腹部大動脈、腸骨静脈、心臓、および腸に由来する組織が、任意のこれらの組み合わせを含め挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

【 0 0 8 6 】

本明細書で使用する場合、対象における疾患「を治療すること」またはその「治療」とは、(1) 疾患に罹りやすいまたは疾患の症状をいまだ示していない対象において、症状または疾患が生ずるのを予防すること；(2) 疾患を阻害すること、またはその発症を阻止すること；あるいは(3) 疾患もしくは疾患の症状を改善すること、またはその退化を引き起こすことを指す。当技術分野において理解されるように、「治療」とは、臨床結果を含む、有益なまたは所望の結果を取得するためのアプローチである。現在の技術の目的に照らせば、有益なまたは所望の結果は、検出可能であるかまたは検出可能でないかを問わず、1つまたは複数の症状の軽減または改善、病状（疾患を含む）の範囲の縮減、病状（疾患を含む）の状態の安定化（すなわち、悪化しない）、病状（疾患を含む）、進行の遅延または低速化、病状（疾患を含む）、状態の改善または緩和、および寛解（部分的であるかまたは全体的であるかを問わない）のうちの1つまたは複数を含み得るが、ただしこれらに限定されない。

10

【 0 0 8 7 】

本明細書で使用する場合、用語「ベクター」には、非分裂性および/または低速分裂性の細胞に感染し、ならびに形質導入する能力および標的細胞のゲノムに一体化する能力を保持する組み換えベクターが意図されている。ベクターは、野生型ウイルスに由来し得るまたは基づき得る。本開示の態様は、アデノ随伴ウイルスベクターと関連する。

20

【 0 0 8 8 】

いくつかのその他のベクター要素、例えばプラスミド、プロモーター、リンカー、シグナル等が本明細書に開示される。これらのベクター要素の性質および機能は、当技術分野において一般的に理解されており、またこれらのベクター要素のいくつかが市販されている。その非限定的な代表的配列、例えば配列番号1～8が本明細書に開示されており、またそのさらなる説明が本明細書において下記に提供され、および/または図3～図10で例証される。

【 0 0 8 9 】

C R I S P R / C a s による狙いを定めたRNA編集 (C R E D I T)

30

RNAを標的とするC R I S P R / C a s (R C a s) を使用して、一ヌクレオチド分解能でプログラム可能なRNA編集を実施するための、効率的で汎用性があり、かつ簡便なプラットフォーム技術が本明細書で開示される。出願者らが「C a s による狙いを定めたRNA編集」または「C R E D I T」と呼ぶこのアプローチは、DNA配列を永続的に変化させることに立脚する、従来のC R I S P R / C a s 9 駆動式ゲノムエンジニアリングとは異なり、遺伝情報を一次的に可逆変化させる手段を提供する。組み換え発現系は、ガイドRNAデザインによる決定に従い、特定のRNA塩基に対して編集を誘発するように工学的に操作される。したがって、いくつかの実施形態では、出願者らは、A D A R デアミナーゼドメインおよび対応する延長されたシングルガイドRNA (e s g R N A) に融合したストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) C a s 9 (d C a s 9) のヌクレアーゼ不活性型バージョンを含む、完全にコーディング可能な組み換え発現系を提供する。いくつかの実施形態では、システムは、リボヌクレオチド塩基修飾を行い、RNA分子の配列が細胞機構により認識される様式を変化させる能力を有するエフェクターデアミナーゼ酵素複合体と共に組み換えタンパク質を生成する。いくつかの実施形態では、C R E D I T 発現系は、A) A D A R (RNA に作用するアデノシンデアミナーゼ) の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型 C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼ (d C a s) をコードする核酸配列と、B) i) 標的アデノシンについてミスマッチを含む標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、i i) d C a s スキャフォールド結合配列、および任意選択的に i i i) 標的RNA配列に対して相補的な配列 (s g R N A の文脈においてスペーサー配列としても知られている) を含む延長

40

50

されたシングルガイドRNA (esgRNA) 配列とを含む。CRISPR発現系コンポーネントを発現する代表的なコンストラクトとして、非限定的に、空間的に分離するために「XTEN」リンカーペプチドを使用してヒトADAR2の触媒的に活性なデアミナーゼドメイン (hADAR2DD、E488QhADAR2DD) に融合したdCas9が挙げられる (図1B)。RBD (RNA結合ドメイン) の代用としてdCas9を用いて、出願者らは、標的特異的A-I編集するために、hADAR2DDをRNA部位に差し向ける独自の短鎖延長配列 (esgRNA) を有するシングルガイドRNA (sgRNA) を工学的に作出し、そしてカスタマイズした。本開示の目的に照らせば、Cas9またはCas9オルソログ (例えば、Cas13 (C2c2としても知られている)、Cpf1、Cas6f/Csy4、CasX、CasY、およびCasRx) 以外のCRISPR/Cas関連エンドヌクレアーゼも、CRISPR発現系で使用するために本明細書に提供される。Wright et al., *Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering*, Cell, Vol. 164 (1-2): 29-44, 2016も参照。

【0090】

本明細書で開示されるいくつかの実施形態では、dCasポリペプチドが、標的RNAを認識するように工学的に操作され、その場合、不活性なCasポリペプチドはエフェクターと会合する。いくつかの実施形態では、dCasポリペプチドは、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) dCas9ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、dCas9ポリペプチドは、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) Cas9ポリペプチド内に、変異、例えばD10A、H840A等、またはその両方を含む。この改作されたまたは工学的に操作されたdCas9ポリペプチド含有核タンパク質複合体はRNAと結合し、本明細書ではRdCas9と呼ばれる。CRISPRは、ヒト細胞においてDNAの簡便にプログラム化された認識を可能にすることによりゲノムエンジニアリングを一新したが、また画像化および遺伝子発現調節における関連技術を支援した。国際公開第2017/091630号パンフレット (本明細書においてそのまま参照として組み込まれている) では、RCas9を使用してRNAを標的とする類似の手段が開発された。このより早期の研究では、工学的に操作された核タンパク質複合体が、Cas9タンパク質およびシングルガイドRNA (sgRNA) を含む。Cas9タンパク質およびsgRNAコンポーネントはいずれも、任意の標的RNA配列を仮想的に認識するように工学的に操作された。任意選択的に、そのようなシステムでは、標的RNAとのハイブリダイゼーションを介してCas9により認識するためのDNA基質をシミュレートするために、(化学的に改変されたまたは合成の) アンチセンスPAMmerオリゴヌクレオチドをRCas9システムに含めることができた。しかし、驚くべきことに、PAMmerを用いなくても、きわめて有効にRNAを標的とすることも明らかとなった。ここで、PAMmerを必要としないRdCas-ADAR RNA編集システムが本明細書において開示されるが、同システムは、したがって標的RNAを改変するための可逆的プラットフォームを提供する、完全にコーディング可能なCas9媒介式のRNA標的システムである。

【0091】

本開示の目的に照らせば、本明細書で使用されるCas9エンドヌクレアーゼとして、非限定的に、古細菌または細菌Cas9ポリペプチドに由来するオルソログが挙げられる。そのようなポリペプチドは、非限定的に、ハロフェラックス・メディテラネイ (*Haloflex mediteranei*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) 亜種ノビシダ (subsp. *novicida*)、パストツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) LMD-9CRISPR3、カンピロバクター・ラリ (*Campylobacter lari*) CF89-12、マイコプラズマ・ガリセプチカム (*Mycoplasma gallisepticum*) F系統、ニトラチフラクター・サルスギニス (*Nitratifactor salsuginis*) DS

10

20

30

40

50

M 1 6 5 1 1 系統、パルビバクラム・ラバメンティボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*)、ロゼブリア・インテスティナリス (*Roseburia intestinalis*)、ネイセリア・シネレア (*Neisseria cinerea*)、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィカス (*Glucanacetobacter diazotrophicus*)、アゾスピリルム属 B 5 1 0、スファエロカエタ・グロブス (*Sphaerochaeta globus*) バディ (Buddy) 系統、フラボバクテリウム・カラムナーレ (*Flavobacterium columnare*)、フルヴィコラ・タフェンシス (*Fluviicola taffensis*)、バクテロイデス・コプロフィルス (*Bacteroides coprophilus*)、マイコプラズマ・モービレ (*Mycoplasma mobile*)、ラクトバチルス・ファルシミニス (*Lactobacillus farciminis*)、ストレプトコッカス・パステウリアヌス (*Streptococcus pasteurianus*)、ラクトバチルス・ジョンソニー (*Lactobacillus johnsonii*)、スタフィロコッカス・シュディンテルメディウス (*Staphylococcus pseudintermedius*)、フィリファクター・アロキス (*Filifactor alocis*)、トレポネーマ・デンティコラ (*Treponema denticola*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) パリス系統、ステレラ・ウォズワーセンシス (*Sutterella wadsworthensis*)、コリネバクター・ジフテリア (*Corynebacter diphtheriae*)、またはストレプトコッカス・アウレウス (*Streptococcus aureus*) ; フランシセラ・ノビスアイダ (*Francisella novicida*) (例えば、フランシセラ・ノビスアイダ (*Francisella novicida*) C P f 1)、またはナトロノバクテリウム・グレゴリー (*Natronobacterium gregoryi*) アルゴノートに由来し得る。このような候補 C a s ポリペプチドのそれぞれは、RNA を標的とするように改変および/または改作され、そして本明細書で開示されるシステムで使用される A D A R デアミナーゼドメインと融合するが、同システムは、ガイド「スキャフォールド配列」を含む、延長された s g RNA (e s g RNA) をさらに含み、ガイド「スキャフォールド配列」は、このような細菌または古細菌微生物それぞれについて、その野生型 (WT) で同一起源のガイド核酸の全部または一部を含む、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、本明細書で用いられる C a s エンドヌクレアーゼとして、非限定的に、C a s 1 3 (c 2 C 2)、C p f 1、C a s X、C a s Y、および C a s R x が挙げられる。

【 0 0 9 2 】

C a s 9 のオルソログおよび生物学的等価物のさらなる非限定的な例は、下記の表に提示される：

【 0 0 9 3 】

10

20

30

40

50

【表 1】

名称	タンパク質配列
<p><i>S. pyogenes</i> Cas9</p> <p>配列番号 1</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD SGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEESFLVE EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMI KFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFQIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDQY DDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYD EHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKD NREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQ SFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKE</p>
	<p>DIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGS DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSLSVDFRKFDFQFY KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAALIKKYPKLESEFVYGDYVYDVRKMIAS EQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG FDSPTVAYSVLVVAKVEKGGKSKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGY KEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH YEKLGSPEDNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLKVLSAYN KHRDKPIREQAENIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLHQ SITGLYETRIDLSQLGGD*</p>
<p><i>Staphylococcus aureus</i> Cas9</p> <p>配列番号 2</p>	<p>MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGAR RLKRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSOKLSEEEFSA LLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKD GEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLVQKAYHQLDQSFIDTYIDLETRRTYYEGP GEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVI TRDENEKLEYEYKQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVSTGKPE FTNLKVYHDIKDITARKEIENAEELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEI EQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVKPKVDLSQOKE IPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQMINE MQKRNRQTNERIEEIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLN NPFNVEVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKGNRTPFQYLSSSDSKISYET FKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLM NLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDALIAN ADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIK DFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKL KKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNLYLTKYS KKDNGPVIKKIKYYGNKLNHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYPYFDVYLDNGV YKFVTVKNLDVIKENYEVNSKCYEEAKLKKISNQAEFIASFYNNDLIKING ELYRVIGVNNDDLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKYST DILGNLYEVKSKKHPQIKKG*</p>

10

20

30

40

50

<p><i>S. thermophilus</i> CRISPR 1 Cas9</p> <p>配列番号 3</p>	<p>MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIHHKNSRIFPAAQAENNLVRRTRNRQGRRL ARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFIALKN MVKHRGISYLLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSQLETKTPGQIQLERYQTYGQ LRGDFTEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEFINRYLEILT GKRKYHGPNEKSRDYGRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEFRAAKASYT AQEFNLLNDLNLVPTETKLSKEQKNQIINYVNEKAMGPAKLFKYIAKLLS CDVADIKGYRIDKSGKAEIHTEAYRKMKTLETLDIEQMDRETLDKLAYVLTNL TEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGWHNFSVKLMMELI PELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNPVAKSVRQAIKI VNAAIKEYGDFDNVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKANKDEKDAAMLK AANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYTGKTIHDLINNSN QFEVDHILPLSITFDDSLANKVLYVATANQEKGQRTPYQALDSMDDAWSFREL KAFVRESKTLNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYASRVVNLALQE HFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTHHHAVDALIAASSQLNL WKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFKAPYQHFVDTLKSKEFEDSI LFSYQVDSKFNKISDATIYATRQAKVGKDKADETYVLGKIKDIYTQDGYDAF MKIYKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPIENYPNKQINDKGKEVPCNPFLKYKE EHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYSKLGHNHIDITPKDSNNKVVLSQVSPWRADV YFNKTTGKYEILGLKYADLQFDKGTGTYKISQEKYNDIKKKEGVSDSEFKFTL YKNDLLLKVDTEKQQLFRFLSRTMPKQKHVELKPYDKQKFEQGEALIKVL GNVANSQCKKGLGKSNISYKVRTDVLGNQHIIKNEGDKPKLDF*</p>	<p>10</p>
<p><i>N. meningitidis</i> Cas9</p> <p>配列番号 4</p>	<p>MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGMAMVEIDEDENPICLIDLGVRFVFERAEVPKTG DSLAMARRLARSVRLTRRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFENGLIKSLPN TPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKG VADNAHALQTDGFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAEILL FEKQKEFGNPHVSGGLKEGIEILLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAA KNTYTAERFIWLTCLNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARK LLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLS PELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIV PLMEQKRYDEACAEIYGDHYGKKNTTEEKTYLPPIPADEIRNPVLRALSQARK VINGVRRYVGGSPARIHIETAREVGSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAFREY FPNFVGEPKSKDILKRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLEKGYVEIDHALPFSRT WDDSFNNKVLVLGSENQKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRS KKQRILLQKFDGDFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGGKRVFASN GQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMN AFDGTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEK LRTLLAEKLSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARKLDEGVS VLRVPLTQLKLDLEKMNREPERKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKY DKAGNRTQQVAVRVEQVQKTGVWVRNHNHGIADNATMVRVDVFEKGDYKY LVPIYSWQVAKGILPDRVVVQKDEEDWQLIDDSFNKFSLHPNDLVEVITKKA RMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEI RPCRLKKRPPVR*</p>	<p>20</p>
		<p>30</p>
		<p>40</p>
		<p>50</p>

<p><i>Parvibaculum lavamentivorans</i> Cas9</p> <p>配列番号 5</p>	<p>MERIFGFDIGTTSIGFSVIDYSSTQSAGNIQRLGVRIFPEARDPDGTPLNQORRQK RMMRRQLRRRRIRRKALNETLHEAGFLPAYGSADWPVVMADPEYELRRRGLE EGLSAYEFGRAIYHLAQHRHFKGRELEESDTPDPDVDEKEAANERAATLKAL KNEQTTLGAWLARRPPSDRKRGIHAHRNVVAEEFERLWEVQSKFHPALKSEEM RARISDTIFAQRPVFRKNTLGEICRFMPGEPLCPKGSWLSQORRMLEKLNLAIA AGGNARPLDAEERDAILSKLQQASMSWPGVRSALKALYKQRGEPGAEKSLK FNLELGGESKLLGNALEAKLADMFGPDWPAHPRKQEI RHAVHERLWAADYGE TPDKKRVILSEKDRKAHREAAANSFVADFGITGEQAAQLQALKLPTGWEPYSI PALNLFLAELEKGERFGALVNGPDWEGWRRNTNFPHRNQPTGEILDKLPSPASKE ERERISQLRNPTVVRTQNELRKVVNNLIGLYGKPDRIEVEGRDVGKSKREREI QSGIRRNEKQRKKATEDLIKNGIANPSRDDVEKWILWKEGQERCPYTGDAQIFN ALFREGRYEVHEIWPSSRSDNSPRNKTLCKRDVNIKGNRMPFEAFGHDEDR WSAIQIRLQGMVSAKGGTGMSPGKVKRFLAKTMPEDFAARQLNDTRYAAKQI LAQLKRLWPDMGPEAPVKVEAVTGQVTAQLRKLWTLNNILADDGEKTRADH RHHALDALTVACTHPGMTNKL SRYWQLRDDPRAEKPALTPPWDITIRADA EKA VSEIVVSHRVRK KVSGLPHKETT YGDTGTDIKTKSGTYRQFVTRKKIESLSK GEL DEIRDPRIKEIVA AHVAGRGGDPKKAFFPPYCVSPGGPEIRK VRLTSKQQLNLM AQTGNGYADLGSNHHIAIYRLPDGKADFEIVSLFDASRRLAQRNPVQRTRADG ASFVMSLAAGEAIMIPEGSKKGIWIVQGVWASGQVVLERDTDADHSTTRPMP NPILKDDAKKVSIDPIGRVVRPSND*</p>
<p><i>Corynebacter diphtheria</i> Cas9</p> <p>配列番号 6</p>	<p>MKYHVGIDVGTFSVGLAAIEVDDAGMPIKTL SLVSHIHDSGLDPDEIKSAVTRL ASSGIARRTRRLYRRKRRRLQQLDKFIQRQGWVIELEDYSDPLYPWK VRAELA ASYIADEKERGEKLSVALRHHIARIIRGWRNPYAKVSSLYLPDGPDAFKAIREEI KRASGQVPVETATVQGMVTLCELGTLKLRGEGGVL SARLQQSDYAREIQEICR MQEIGQELYRKIIDVVF AAESP KGSASSRVGKDPLQPGKNRALKASDAFQRYRI AALIGNLRVRVDGEKRLSVEEKNL VFDHLVNLTPKKEPEWVTIAEILGIDRGQL IGTA TMTDDGERAGARPPHTD TNRSIVNSRIAPLVDWWKTA SALEQHAMVKAL SNAEVDDFDSPEGAKVQAFFADLDDDVHAKLDSLHLPVGRAAYSED TLVRLTR RMLSDGVDLYTARLQEFGIEPSWTPPTPRIGEPVGNPAVDRVLKTVSRWLESAT KTWGAPERVIIHVREGFVTEKRAREMDGDMRRRAARNAKLFQEMQEKLVNQ GKPSRADLWRYQSVQRQNCQACAYCGSPITFSNSEMDHIVPRAGQGSTNTRENL VAVCHRCNQSKGNTPFPAIWAKNTSIEGVSVKEAVERTRHWVTDTGMRSTDFK KFTKAVVERFQRATMDEEIDARSMESVAWMANELRSRVAQH FASHGTTVRVY RGSLTAEARRASGISGK LKFFDGVGKSRLDRRHHAIDAA VIAFTSDYVAETLAV RSNLKQSQAHRQEAPQWREFTGKDAEHRAAWRVWCQKMEKLSALLTEDLRD DRVVVMSNVRLRLGNLSAHKETIGKLSKVKLSSQLSVSDIDKASSEALWCALT REPGFDPKEGLPANPERHIRVNGTHVYAGDNIGLFPVSAGSIALRGGY AELGSSF HHARVYKITSGKKPAFAMLRVYTIDLLPYRNQDLFSVELKPQTM SMRQAEKLR DALATGNAEYLGWL VVDDDELVDTSKIATDQVKAVEAELGTIRRWVVDGFF SPSKLRRLRPLQMSKEGIKKESAPELSKIIDRPGWLPVANKLFS DGNVTVVRD SLGRVRL ESTAHLPVTWKVQ*</p>

10

20

30

40

50

<p><i>Streptococcus pasteurianus</i> Cas9</p> <p>配列番号 7</p>	<p>MTNGKILGLDIGIASVGVGIIIAKTGKVVHANSRLFSAANAENNAERRGFRGSR RLNRRKKHRVVRDLFEKYGIVTDFRNLNLPYELRVKGLTEQLKNEELFAA LRTISKRRGISYLDDEDDSTGSTDYAKSIDENRRLKLNKTPGQIQLERLEKYGQ LRGNFTVYDENGEAHLINVFSTSDYEKEARKILETQADYNKKITAEFIDYVEI LTQKRKYHGPNEKSRDYGRFRDTGTTLENIFGILIGKCNFYDPDEYRASKAS YTAQEYNFLNDLNNLKVSTETGKLSTEQKESLVEFAKNTATLGPALKLKEIAKI LDCKVDEIKGYREDDKPKDLHTFEPYRKLKFNLESINIDDLREVIDKLADILT LNTEREGIEDAIKRNLPNQFTEEQISEIIVRKSQSTAFNKGWHSFSAKLMNELIP EL YATSDEQMTILTRLEKFKVNKSSKNTKTIDEKEVTDEIYNPVVAKSVRQTIK IINA AVKKYGDFDKIVIEMPRDKNADDEKKFIDKRNKENKKEKDDALKRAAYL YNSSDKLPDEVFHGNKQLETKIRLWYQQGERCLYSGKPSIQELVHNSNNFEID HILPLSLSFDDSLANKVLVYAWTNQEKGQKTPYQVIDSMDAAWFSREM KDYV LKQKGLGKKKRDYLLTTENIDKIEVKKKFIERNLVDTRYASRVVLSLQALRE LGKDTKVSVVRGQFTSQLRRKWKIDKSRETYHHHAVDALIIAASSQLKLWEKQ DNP MFVDYGNQVVDKQTGEILSVSDDEYKELVFQPPYQGFVNTISSKGFEDI LFSYQVDSKYNRKVSDATYSTRKAKIGKDKKEETYVLGKIKDIYSONGFDTFIK KYNKDKTQFLMYQKDSL TWENVIEVILRDYPTTKKSEDGKNDVKCNPFEEYRR ENGLICKYSKKGKGTPIKSLKYDKKLGNCIDITPEESRNK VILQSINPWRADVY FNPETLKYELMGLKYSDSLFEKGTGNYHISQEKYDAIKEKEGIGKKSEFKFTLY RNDLILIKDIASGEQEIYRFLSRTMPNVNHYVELKPYDKEKFDNVQELVEALGE ADKVGRCIKGLNKNPNIYKVRTDVLGNKYFVKKKGDKPKLDFKNNKK*</p>	10
<p><i>Neisseria cinerea</i> Cas9</p> <p>配列番号 8</p>	<p>MAAFKPNPMNYILGLDIGIASVGVWAIVEIDEEENPIRLIDLGVRFERAEVPKTG DSLAAARRLARSVRRLTRRAHRLLRARLLKREGVLQAADFENGLIKSLPN TPWQLRAAADRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKG VADNTHALQTDGFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFNRKDLQAE LNL LFEKQKEFGNPHVSDGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPTPKA AKNTYTAERFVWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSCLTYAQA RKLLDLDDTAFFKGLRYGKDNAEASTL MEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPL NLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFFVQISL KAL RRIVPLMEQGNRYDEACTEYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQ ARK VINGVVRRYGSPARIHETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKSAAKF REYFPNFVGEPSKDILKLRLYEQQH GKCLYSGKEINLGR LNEKGYVEIDHALP FSRTWDDSFNKNVLALGSENQKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSR FPRSKQRILLQKFEDEDFKERNLNDTRYINRFLCQFVADHMLLTGKGKRRVF ASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRH HALDAVVVACSTIAMQKQITRFVRYKE MNAFDGTIDKETGEVLHQAHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADT PEKLR TLLAEKLSRPEAVHKYVTPLFISRAPNRKMSGQGHMETVKSARLDE GISVLRVPLTQLKLDLEKMNREREP KLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFPY KYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVV VHNHNGIADNATIVRVDVFEKGGKY YLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGKDEEDWTVMDDSFEKFFVLYANDLIKLTAK KNEFLGYFVSLNRATGAIDIRTHD TDSTKGKNGIFQSVGVKTALSFQKYQIDEL GKEIRPCRLKKRPPVR*</p>	20
		30
		40
		50

<p><i>Campylobacter lari</i> Cas9 配列番号 9</p>	<p>MRILGFDIGINSIGWAFVENDELKDCGVRIFTKAENPKNKESLALPRRNARSSRR RLKRRKARLIAIKRILAKELKLNKYDYVAADGELPKAYEGSLASVYELRYKALT QNLETKDLARVILHIAKHRGYMNKNEKKSNDACKGKILSALKNNALKLENYQS VGEYFYKEFFQKYKNTKNFKIRNTKDNYNVCVLSSELEKELKLEKQKEFG YNYSEDFINEILKVAFFQRPLKDFSHLVGACTFFEEERACKNSYSAWEFVALT KIINEIKSLEKISGEIVPTQTINEVLNLILDKGSITYKKFRSCINLHESISFKSLKYDK ENAENAKLIDFRKLVFVKALGVHLSRQELDQISTHITLIKDNVKKLVLEKYN LSNEQINNLEIEFNDYINLSFKALGMILPLMREGKRYDEACEIANLKPCTVDEK KDFLPAFCDSIFAHESNPVVRRAISEYRKVLNALLKKGKVKHVKHLELARDVG LSKKAREKIEKEQKENQAVNAWALKECENIGLKASAKNILKLLWKEQKEICIY SGNKISIEHLKDEKALEVDHIYPYRSFDDSFINKVLVFTKENQEKLNKTPFEAF GKNIEKWSKIQTALQNLPHYKKNKILDENFKDKQEDFISRNLDNDTRYIATLIAK YTKEYLNFLLLSENENANLKSGEKGSKIHVQITSGMLTSLRHTWGFDDKDRN NHLHHALDAIVAYSTNSIIFAFSDFRKNQELLKARFYAKELTSDNYKHQVKVFFE PFKSFREKILSKIDEIFVSKPPRKRARRALHKDTFHSENKIIDKCSYNSKEGLQIAL SCGRVRKIGTKYVENDTIVRVDIFKKQNKFYAIPYAMDFALGILPNKIVITGKD KNNNPKQWQTIDESYEFCSLYKNDLILQKKNMQEPEFAAYNDFSSISSTICVE KHDNKFENLTSNQKLLFSNAKEGSKVSVESLGIQNLKVFKEYIITPLGDKIKADFFQ PRENISLKTSSKYGRL*</p>	10
<p><i>T. denticola</i> Cas9 配列番号 10</p>	<p>MKKEIKDYFLGLDVGTVGSVWAVTDTDYKLLKANRDLWGMRCFETAETA VRRLHRGARRRIERRKRIKLLQELFSQEIATDEGFFORMKESPFYAEDKTILO ENTLFNDKDFADKTYHKAYPTINHLIKAWIENKVKPDPRLLYLACHNIKKRKH FLFEGDFDSENQFDTSIQALFEYLREDMEVDIDADSQKVEILKDSLKNSEKQS RLNKILGLKPSDKQKAITNLISGNKINFADLYDNPDLKDAEKNSISFSKDDFDA LSDDLASILGDSFELLLKAKAVYNCVLSKVIQDEQYLSFAKVKIYEKHKTDLT KLKNVKKHFPKDYKVFVGYNKNEKNNNNYSGYVGVCKTKSKKLIINNSVNQ EDFYKFLKTILSAKSEIKEVNDILTEIETGTFLPKQISKNAEIPYQLRMELEKIL SNAEKHFSFLKQKDEKGLSHSEKIIMLLTFKIPYYIGPINDNHKKFFPDRCWVVK KEKSPSGKTPWNFFDHIDKEKTAEAFITSRTNFCTYL VGESVLPKSSLLYSEYT VLNEINLQIIDGNICDIKLLKQKIYEDLFKKYKKITQKQISTFIKHEGICNKDTE VIILGIDKECTSSLKSYIELKNIFGKQVDEISTKNMLEEIIRWATYDEGEGKTIK TKIKAEYGKYCSDEQIKILNLKFSGWGRLSRKFLFETVTEMPGFSEPVNIITAM RETQNNLMELLSSEFTFTENIKKINSGFEDAEEKQFSYDGLVKPLFLSPSVKML WQTLKLVKEISHITQAPPKIFIEMAKGALEPARTKTRKILQDLYNNCKNDA DAFSSEIKDLSGKIENEDNLRRLSDKLYLYTQLGKCMYCGKPIEIGHVFDTSNY DIDHIYPQSKIKDDISNRVLVCSSCNKNEDEKYLKSEIQSKQRGFWNFLQRNN FISLEKLNRLTRATPISDDEAKFIARQLVETRQATKVAAKVLEKMPVETIKIYVS KAETVSMFRNKFDIVKCREINDFHHAHDAYLNIVVGNVYNTKFTNNPWNFIKE KRDNPKIADTYNYKVFYDVKRNNITAWKGGTIITVKDMLKRNTPYTRQA ACKKGELFNQTIMKKGLGQHPKKEGPFNSISKYGGYNKVSAAYYTLIEYEK GNKIRSLETIPLYLKDIQKQDQVLSYLDLLGKKEFKILVPKIKINSLKINGF PCHITGKTNDSFLLRPAVQFCCSNNEVLYFKKIIFSEIRSQREKIGKTISPVEDLS FRSYIKENLWKKTKNDEIGEKEFYDLLQKKNLEIYDMLLTKHKDTIYKRPNSA TIDILVKGKEKFKSLIENQFEVILEILKLFSA TRNVSDLQHIGGSKYSGVAKIGNK ISSLDNCILYQSITGIFEKRIDLKLV*</p>	20
<p><i>S. mutans</i> Cas9 配列番号 11</p>	<p>MKKPYSIGLDIGTNSVWAVVTDDYKVPKMKMKVLGNTDKSHIEKNLLGALL FDSGNTAEDRRKRTARRRYTRRRNRILYLQEIFSEEMGKVDDSFHRLSDSFL VTEDKRGERHPFGNLEEVKYHENFPTIYHLRQYLADNPEKVDLRLVYLALAH IIFRGRHFLIEGKFDTRNNDVQRLFQEFLLAVYDNTFENSSLQEQNVQVEEILTDKI SKSAKDRVLKLPNEKSNRFAEFLKLVGNQADFKKHFELEEKAPLQFSKDT YEEELVLLAQIGDNYAELFLSAKLYDSILLSGILTVDVGTAPLSASMIQRY NEHQMDLAQLKQFIRQKLSDKYNEVFSVSKDGYAGYIDGKTNQEAFYKYK GLLNKIEGSGYFLDKIEREDFLRKQRTFDNGSIPHQIHLQEMRAIIRRAEFYPL ADNQDRIEKLTLFRIPYYVGPLARGKSDFAWLSRKSAKTIPTWNFDEIVDKESS</p>	30
		40

	<p>AFAFINRMTNYDLYLPNQKVLPHKSHLLYEKFTVYNELTKVKYKTEQGKTAFFD ANMKQEIFDGVFKVYRKVTKDKLMDLFLEKEFDEFRIVDLTGLDKENKVFNASY GTYHDLCKILDKDFLDNSKNEKILEDIVLTLTFEDREMIRKRLNYSDLLTKEQ VKKLERRHYTGWGRLSAELIHGIRNKESRKTILDYLDIDGNSNRNFMQLINDDA LSFKEEIAKAQVIGETDNLNQVVSADIAGSPAIAKKGILQSLKIVDELVKIMGHQPE NIVVEMARENQFTNQGRNSQORLKGLTDSIKEFGSQILKEHPVENSQQLQNDRL FLYYLQNGRDMYTGEELDIDYLSQYDIDHIIPQAFIKDNSIDNRVLTSSKENRGK SDDVPSKDVVRKMKSYWSKLLSAKLITQRKFDNLTKAERGGGLTDDDKAGFIKR QLVETRQITKHVARILDERFNTETDENNKIRQVKIVTLKSNLVSFRKEFELYK VREINDYHHAHDAYLNAVIGKALLGVYPQLEPEFVYGDYPHFHGHKKNKATA KFFYSNIMNFFKDDVRTDKNGEIIWKKDEHISNIKKVLSYPQVNVKKEVEEQ TGGFSKESILPKGNSDKLIPRKTCKFYWDTKKYGGFDSPIVAYSILVIADIEKGKS KKLKTVKALVGVTIMEKMTFERDPVAFLERKGYRNVQEENIKLPKYSLFKLEN GRKRLASARELQKGNIEVLPNHLGTLHYAKNIHKVDEPKHLDYVDKHKDEF KELLDVVSNSFKKYTLAEGNLEKIKELYAQNNGEDLKEASSFINLLTFTAIGAP ATFKFFDKNIDRKRYTSTTEILNATLIHQSIITGLYETRIDLNKLGGD</p>	10
<p><i>S. thermophilus</i> CRISPR 3 Cas9 配列番号 12</p>	<p>MTKPYSIGLDIGTNSVGWAVTTDNYKVPSKMMKVLGNTSKKYIKKNLLGVLLF DSGITAEGRRLLKRTARRRYTRRRNRILYLQEIFSTEMATLDDAFFQRLDSSFLVP DDKRDSKYPIFGNLVEEKAYHDEFPTIYHLRKYLAADSTKKADRLVYLAALAHM IKYRGHFLIEGFEFNSKNNDIQKNFQDFLDTYNAIFESDLSLENSKQLEEVKDKIS KLEKDRILKLPGEKNSGIFSEFLKLVGNQADFRKCFNLDEKASLHFSKESYD EDLETLLGYIGDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVDNTEAPLSSAMIKRYN EHKEDLALLKEYIRNLSLKYNEVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYLKLL LAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIPYQIHLQEMRAILDQAKFYFPFLA KNKERIEKILTFRIPYYVGPLARGNSDFAWSIRKRNKIPWNFEDVIDKESSAE AFINRMTSFDLYLPEEKVLPHKSHLLYETFNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSK QKKDIVRLYFKDKRKVTDKDIIEYLHAIYGYDGIELKGIEKQFNSSLSTYHDLN IINDKEFLDSSNEAIIIEIHTLTIFEDREMIKQRLSKFENIFDKSVLKKLSRRHYT GWGKLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLDIDGNSNRNFMQLIHDDALSFKKKIQAQ IIGDEDKGNIEKVVKSLPGSPAIAKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMARE NQYTNQGKSNSQORLKRLEKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLY YLQNGKDMYTGDIDLIDRLSNYDIDHIIPQAFLKDNSIDNKVLVSSASNRGKSD DVPSLEVVKRKTTFWYQLLKSLSQRKFDNLTKAERGGGLSPEDKAGFIQRQLV ETRQITKHVARLLDEKFNKKDENNRVAVRTVKIITLKSTLVSQFRKDFELYKVR EINDFHHAHDAYLNAVVASALLKYPKLEPEFVYGDYPKYNFRERKSATEKV YFYSNIMNIFKKSISLADGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLATVRRVLSYPQ VNVVKKVEEQNHGLDRGKPKGLFNANLSSKPKPNSNENLVGAKEYLDPKKYG GYAGISNSFTVLVKGTIEKGAKKITNVLEFQGISILDRINYRKDKLNFLEKGY KDIELIIEPKYSLFELSDGSRMLASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFKLLYH AKRISNTINENHRKYVENHKKEFEEFYIIEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSW QNHSIDELCSSFIGPTGSEKGLFELTSRGSAADEFGLGVKIPRYRDTSPSSLLKD ATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGE</p>	20 30 40

<p><i>C. jejuni</i> Cas9</p> <p>配列番号 13</p>	<p>MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSAR KRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNVEDYQSFDESLAKAYKGSLSIPYELRFRAL NELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQSVG EYLYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIQSFLKDELKLIKQREFGFSF SKKFEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSSFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIIN LLNNLKNTEGILYTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKG TYFIEFKKYKEFIKALGEHNSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQ IDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVINATEDKKDFL PAFNETYYKDEVTPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGVHVKINIELAREVGVKNH SQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKGLKINSKNILKRLRFKEQKEFCAYSGE KIKISDLQDEKMLEIDHIYPYRSFDDSYMNVLVFTKQKQEKLNQTPFEAFGN DSAKWQKIEVLAKNLPKTKQKRILDKNYKDKKEQKNFKDRNLNDRYIARLVL NYTKDYLDLPLSDDENTKLNQKQKGVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKD RNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQSNSAELYAKKISELDYKNRK FFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSYGGKEGVL KALELGKIRKVNKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLPNK AVARSKKGEIKDWILMDENYEFCSFLYKDSLILIQTKDMQPEFVYNAFTSST VSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEKYIVSALGEVT KAEFRQREDFKK</p>	10
<p><i>P. multocida</i> Cas9</p> <p>配列番号 14</p>	<p>MQTTNLSYLGLDLGIASVGVAVVEINENEDPIGLIDVGVRIFERAEVPKTGESL ALSRRLARSTRRLIRRAHRLLLAKRFLKREGILSTIDLEKGLPNQAWELRVAGL ERRLSAIEWGAVLLHLIKHRGYLSKRKNESQTNNKELGALLSGVAQNHQLLQS DDYRTPAELALKKFAKEEGHIRNQRGAYTHTFNRLDLLAELNLLFAQQHQFGN PHCKEHIQQYMETELLMWQKPALSGEAILKMLGKCTHEKNEFKAAKHTYSAER FVWLTKLNNLRILEDGAERALNEEERQLLINHPYEKSKLTYAQVRKLLGLSEQA IFKHLRYSKENAESATFMELKAWHAIRKALENOGLKDTWQDLAKKPDLLDEIG TAFSLYKTDEDIQQYLTNKVPNSVINALLVSLNFDKFIELSLKSLRKLPLMEQG KRYDQACREIYGHHYGEANQKTSQLLPAIPAQEIRNPVVLRTLSQARKVINAIIR QYGSPARVHIETGRELKSFKERREIQKQEDNRTKRESAVQKFKELFSDFSSEP KSKDILKFRLYEQQHKGCLYSGKEINIHRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNN KVLVLAENQKNGNQTPYEWLQKINSERWKNFVALVLSQCSAAKQRLLT QVDDNKFIDRNLNDRYIARFLSNYIQENLLL VGKNKNVFTPNGQITALLRSR WGLIKARENNNRHHALDAIVVACATPSMQQKITRFRIRKFEVHPYKIKENRYEMV DQESGEIISPFPPEPWAYFRQEVNIRVFDNHPDVLKEMLPDRPQANHQFVQPL FVSRAPTRKMSGQGHMETIKSAKRLAEGISVLRIPLTQLKPNLENMVKEREP ALYAGLKLARLAEFNQDPAKAFATPFYKQGGQVKAIRVEQVQKSGVLVRENN GVADNASIVRTDVFINKNKFFLVPIYTWQVAKGILPNKAIVAHKNEDEWEEMD EGAKFKFSLFPNDLVELKTKKEYFFGYIIGLDRATGNISLKEHDGEISKGKDGV YRVGVKLLALSFEKYQVDELGKNRQICRPQQRQPVR</p>	20
<p><i>F. novicida</i> Cas9</p> <p>配列番号 15</p>	<p>MNFKILPIAIDLGVKNTGVFSAFYQKGTSLERLDNKNKGKVVYELSKDSYTLMMNN RTARRHQRRGIDRKQLVKRFLKLIWTEQLNLEWDKDTQQAISFLNRRGFSFIT DGYSPEYLNIVPEQVKAILMDIFDDYNGEDDLDSYLKLATEQESKISEIYNKLM QKILEFKLMKLCCTDIKDDK VSTKTLKEITSYEFELLADYLANYESLKTQKFSYT DKQGNLKELSYYHHDKYNIQEFKLRHATINDRILDITLTDLDIWNFNFEKDFD DKNEEKLQNQEDKDHIAHLHHFVFAVNIKIKSEMASGGRRHSQYFQEITNVLD ENNHQEGYLNFCENLHNKKYSNLSVKNLVNLIGNLSNLELPLRKYFNDKIH AKADHWDEQKFTETYCHWILGEWRVGVKQDKKDGAKYSYKDLKCNELKQK VTKAGLVDFLELDPCRTIPPYLDNNNRKPPKCQSLILNPKFLDNQYPNWQQYL QELKQLSQIYNLDSFETDLKVLKSSKQPYFVEYKSSNQIASGQRDYKDLDA RILQFIFDRVKASDELLLNEIYFQAKKLLKQKASSELEKLESSKLLDEVIANSQLSQ ILKSQHTNGIFEQGTFLHLVCKYKQRQRARDSRLYIMPEYRYDKLHKYNNT GRFDDDNQLLTYCNHKPRQKRYQLLNDLAGVLQVSPNFKDKIGSDDDLFISK WLVEHIRGFKKA CEDSLKIQKDNRGLLNHNKINIARNTKKGKCEKEIFNLICKIEGS</p>	30
		40

	<p>EDKKGNKYKHGLAYELGVLLFPGEPNEASKPEFDRKIKKFNSISYSAQIQQIAFAER KGNANTCAVCSADNAHRMQQIKITEPVEDNPKDKIILSAKAQRLPAIPTRIVDGA VKKMATILAKNIVDDNWQNIKQVLSAKHQLHIPITESNAFEFEPALADVKGKS LKDRRKALERISPENIFKDKNNRIKEFAKGISAYSGANLTDGDFDGAKEELDHI IPRSHKKYGTLNDEANLICVTRGDNKNKGNRIFCLRDADNYKPKQFETDDLE IEKKIADTIWDANKKDFKFGNYRSFINLTPQEQKAFRHALFLADENPIKQAVIRA INNRNRTFVNGTQRYFAEVLANNIYLRAKKENLNTDKISFDYFGIPTIGNGRGIA EIRQLYEKVDSDIQAYAKGDKPQASYSHLIDAMLAFCIAADEHRNDGSIGLEID KNYSLYPLDKNTGEVFTKDIFSQIKITDNEFSKDLVKKRKAIEGFNTHRQMTDR GIYAENYLPLIHKELNEVRKGYTWKNSEEIKIFKGGKYDQIQQLNLYVYCKLV DKPISIDIQISTLEELRNILTTNNIAATAEYYYINLKTQKLEHYIENYNTALGYK KYSKEMEFLRSLAYRSERVKIKSIDDVKQVLDKDSNFHIGKITLFFKKEWQRLYR EWQNTTIKDDYEFKSFVNKSTITKHLKKVRKDFSLPISINEGKFLVRKKTWDN NFIYQILNDSRSDRADGTPKPFIPAFDISKNEIVEAIDSFTSKNIFWLPKNIELQKVD NKNIFAIDTSKWFEVETPSDLRDIGIATIYKIDNNSRPFVVRVKLDYVIDDDSKIN YFMNHSLLSRYPDKVLLEILKQSTIIEFESESGFNKTIKEMLGMKLAGIYNETSNN</p>	10
<p><i>Lactobacillus buchneri</i> Cas9 配列番号 16</p>	<p>MKVNNYHIGLDIGTSSIGWVAIGKDGKPLRVKGKTAIGARLFQEGNPAADRRM FRTRRRRLSRRKWRLKLEEIFDPYITPVDSTFFARLKQSNLSPKDSRKEFKGSM LFPDLTDMQYHKNYPTIYHLRHALMTQDKKFDIRMVYLAIHHIVKYRGNFLNS TPVDSFKASKVDFVDQFKKLNELYAAINPEESFKINLANSEDIGHQFLDPSIRKF DKKKQIPKIVPMMNDKVTDRLNGKIAEIIHAILGYKAKLDVVLCQTPVDSKP WALKFDDDEDIDAKLEKILPEMDENQQSIVAILQNLYSQVTLNQIVPNGMSLS MIEKYNDHHDHKLKYLKLDQLADPKKAVLKKAYSQYVGGDDGKVIEQAEFW SSVKKNLDDSELKQIMDLIDAEKFMFKQRTSQNGVIPQLHQRELDIEIHHQSK YYPWLVEINPNKHDLHLAKYKIEQLVAFRVPYYVGPMTPKDQAESAETVFSW MERKGTETGQITPWNFDEKVDKASANRFIKRMITKDTYLGEDVLPDESLLYE KFKVLNELNMVVRVNGKLLKVADKQAIFQDLFENYKHVSVKKLQNYIAKATGL PSDPEISGLSDEHFNNSLGTYNDFKKLFGSKVDEPDLQDDFEKIVEWSTVFEDK KILREKLNEITWLSQQKDVLESSRYQGWGRLSKLLTGIVNDQGERIIDKLWN TNKNFMQIQSDDDFAKRIEANADQMAVDVEDVLADAYTSPQNKKAIRQVY KVVDIQQKAMGGVAPKYISIEFTRSEDRNPRRTISRQRQLENTLKD TAKSLAKSI NPELLSELDNAKSKKGLTDRLYLYFTQLGKDIYTGEPIINDELNKYDIDHILPQ AFIKDNSLDRVLRVLTAVNNGKSDNVPLRMFGAKMGHFWKQLAEAGLISKRR LKNLQTDPTISKYAMHGFIRRLVETSQVILVANILGDKYRNDDTKIIETAR MNHQMRDEFGFIKNREINDYHHAFDAYLTAFLGRYLYHRYIKLRPYFVYGGDFK KFREDKVTMRNFNLDLDDTQEKIADAETGEVIWDRENSIQQLKDVYHYKF MLISHEVYTLRGAMFNQVYPASDAGKRKLIPVKADRPVNVPYVGGYSGSADAY MAIVRIHNNKGDYRVVGVPMRALDRDLDAAKNVSADDFDRALKDVLPALQLT KTKKSRTGKITQVIEDFEIVLGVMYRQLMIDGGKFKMLGSSTYQYNQQLV LSDQSVKTLASKGRLDPLQESMDYNNVYTEILDKVNQYFSLYDMNKFHKLN LGFSKFISFPNHNVLDGNTKVSSEKREILQEILNGLHANPTFGNLKDVGITPPFG QLQQPNGILLSDKETIRYQSPITGLFERTVSLKDL</p>	20
<p><i>Listeria innocua</i> Cas9 配列番号 17</p>	<p>MKKPYTIGLDIGTNSVGWAVLTDQYDLVKKRMKIAAGDSEKKQIKKNFWGVRL FDEGQTAADRRMARTARRRIERRRNRISYLGIFAEMSKTDANFFCRLSDSFY VDNEKRNSRHPFFATIEEEVEYHKNYPTIYHLREELVNSSEKADLRLVYLA LAHI IKYRGNFLIEGALDQNTSVDGIYKQFIQTYNQVFASGIEDGSLKLEDNKDVA KILVEK VTRKEKLERILKLYPGEKSAGMFAQFISLIVGSKGNFQKPFDLIEKSDIE CAKDSYEEDESLALIGDEYAELFVAAKNAYS AVVLSIITVAETETNAKLSAS MIERFDTHEEDL GELKAFIKLHLPKH YEEIFSNTEKHGYAGYIDGKTKQADFYK YMKMTLENIEGADYFIAKIEKENFLRKQRTFDNGAIPHLHLEEAILHQQAK YYPFLKENYDKIKSLVTRIPYFVGPLANGQSEFAWLTRKADGEIRPNIEEKV DFGKSAVDFIEKMTNKDTYLPKENVLPKHSCLCYQKYL VYNELTKVRYINDQGG TSYFSGQEKQIFNDLFKQKRRVKKDLLEFLRNM SHVESPTIEGLEDSFNSSYS TYHDLLKVGIKQEILDNPVNTMLENIVKILTVFEDKRMIKEQLQQFSDVLDGV</p>	30
		40

	<p>VLKCLRERRHYTGWGRLSAKLLMGIRDKQSHLTILDYLMNDDGLNRNLMQLIN DSNLSFKSHIEKEQVTTADKDIQSIVADLAGSPAIKKGIQLKIVDELVSVMGY PQTIVVEMARENQTTGKGKNSRPRYKSLEKAIKEFGSQILKEHPTDNQELRNN RLYLYLQNGKDMYTGQDLDIHNSNYDIDHIVPQSFITDNSIDNLVLTSSAGN REKGDDVPPLEIVRKRKVFWEKLYQGNLMSKRKFDYLTKAERGGLTEADKAR FIHRQLVETROITKNVANILHQRFNYEKDDHGNTMKQVRIVTLKSALVSQFRKQ FQLYKVRDVNDYHHAHDAYLNGVVANTLLKVYPQLEPEFVYGDYHQFDWFK ANKATAKKQFYTNIMLFFAQKDRIIDENGEILWDKKYLDTVKKVMSYRQMNIV KKTEIQKGEFSKATIKPKGNSSKLIPRKTNWDPMKYGGLDSPNMAYAVVIEYA KGKNKLVFEKKIIRVTIMERKAFEKDEKAFLEEQGYRQPKVLAKLPKYTLYECE EGRRRMLASANEAQKGNQVLPNHLVTLHHAANCEVSDGKSLDYIESNREM FAELLAHVSEFAKRYTLAEANLNKINQLFEQNKEGDIKAIQSFVDLMAFNAM GAPASFKFFETTIERKRYNNLKELLNSTIYQSITGLYESRKRLLDD</p>	10
<p><i>L. pneumophila</i> Cas9 配列番号 18</p>	<p>MESSQILSPIGIDLGGKFTGVCLSHLEAFAELPNHANTKYSVILIDHNNFQLSQA QRRATRHRVRNKKRNQFVKRVALQLFQHILSRDLNAKEETALCHYLNRRGYT YVDTDLDEYIKDETTINLLKELLPSESEHNFIDWFLOKMQSSEFRKILVSKVEEK KDDKELKNAVKNIKNFITGFEKNSVEGHRHRKVYFENIKSDITKDNQLDSIKKKI PSVCLSNLLGHLSNLQWKNLHRYLAKNPKQFDEQTFGNEFLRMLKNFRHLKGS QESLAVRNLIQQLEQSQDYISILEKTPPEITIPPYEARTNTGMEKDQSLLNPEKL NNLYPNWRNLIPGIIDAHFPLEKDLEHTKLRDRKRIISPSKQDEKRDSYILQRYLD LNKKIDKFKIKKQLSFLGQKQLPANLIETQKEMETHFNSSLVSVLIQIASAYNK ERDAAQGIWFDNAFSLCELSNINPPRKQKILPLLVGAILSEDFINNKDKWAKFK IFWNTHKIGRTSLKSKCKEIEEARKNSGNAFKIDYEEALNHPEHSNNKALIKIQT IPDIIQAIQSHLGHNDSQALYHNPFSLSQLYTILETKRDGFHKNCVAVTCENYW RSQKTEIDPEISYASRLPADSVRPFQVGLARMMQRLAYEIAMAKWEQIKHIPDN SLLPIYLEQNRFEFEESFKKIKGSSSDKTLEQAIEKQNIQWEEKFORIINASMNI CPYKGASIGGQGEIDHIYPRSLSKKHFGVIFNSEVNLIYCSSQGNREKKEEHYLL EHLSPLYLKHQFGTDNVSDIKNFISQNVANIKKYISFHLLTPEQQKAARHALFLD YDDEAFKTITKFLMSQQKARVNGTQKFLGKQIMEFLSTLADSKQLQLEFSIKQIT AEEVHDHRELLSKQEPKLVKSRQQSFPSHAIDATLTMSIGLKEFPQFSQELDNS WFINHLMPDEVHLNPVRSKEKYNKNPISSTPLFKDSLYAERFIPVWVKGETFAIG FSEKDLFEIKPSNKEKLFLLKTYSTKNPGESLQELQAKSKAKWLYFPINKTLAL EFLHHYFHKEIVTPDDTTVCHFINSRYYTKKESITVKILKEPMPVLSVKFESSKK NVLGSFKHTIALPATKDWERLFNHPNFLALKANPAPNPKEFNEFIRKYFLSDNN PNSDIPNNGHNIKPKHKA VRKVFSLPVIPGNAGTMMRIRRKDNKGQPLYQLQ TIDDTPSMGIQINEDRLVKQEVLMDAYKTRNLSTIDGINNSEGQAYATFDNWLT LPVSTFKPEIKLEMKPHSKTRRYIRITQSLADFIKTIDEALMIKPSDSIDDPLNMP NEIVCKNKLFGNELKPRDGKMKIVSTGKIVTYEFESDSTPQWIQTLYVTQLKKQ P</p>	20 30

<p><i>N. lactamica</i> Cas9</p> <p>配列番号 19</p>	<p>MAAFKPNPMNYILGLDIGIASVGMAMVEVDEEENPIRLIDLGVRFERAEVPKT GDSLAMARRLARVRRLLTRRRRAHRLLRARRLLKREGVLQDADFDENGLVKSL PNTPWQLRAAALDRKLTCLLEWSAVLLHLVKHRGYLSQRKNEGETADKELGAL LKGVADNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAE LNLLEKQKEFGNPHVSDGLKEDIETLLMAQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAE PKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYA QARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAAESTLMEKAYHAISRLEKEGLKDKKS PLNLSTELQDEIGTAFSLFKTDKIDITGRLLKDRVQPEILEALLKHISFDKVFQISLK ALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYCKKNAEKKIYLPPIPADEIRNPVLRRA LSQARKVINCVRVRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRDKREKAA AKFREYFPNFVGEPKSKDILKRLRYEQHGKCLYSGKEINLVRLEKGYVEIDH ALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVE TSRFRPSKKQRILLQKFDDEGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGRR VFASNGQITNLLRGFWGLRKRVTENDRRHHALDAVVVACSTVAMQKQITFRV YKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKAHFQPPWEFFAQEVMIKRVFGKPDGKPEFEE ADTPEKLRLLAEKLSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARK LDEGISVLRVPLTQLKLGLEKMNREPERKLYDALKAQLETHKDDPAKAFAE PFYKYDKAGSRTQQVKA VRIEQVQK TG VVVRNHNGIADNATMVRVDVFEKG GKYLLVPIYSWQVAKGILPDRAVVAFKDEEDWTVMDDSFEFVLYANDLIK TAKKNEFLGYFVSLNRATGAIDIRTHD TDSTKGKNGIFQSVGVK TALSFKQNKI DELGKEIRPCRLKKRPPVR</p>	10
<p><i>N. meningitides</i> Cas9</p> <p>配列番号 20</p>	<p>MAAFKPNPINYLGLDIGIASVGMAMVEIDEDENPICLIDLGVRFERAEVPKTG DSLAMARRLARVRRLLTRRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPN TPWQLRAAALDRKLTPLLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKG VADNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAEILL FEKQKEFGNPHVSCGLKEGIEILLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAA KNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARK LLGLEDTAFFKGLRYGKDNAAESTLMEKAYHAISRLEKEGLKDKKSPLNLS PELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLLKDRIQPEILEALLKHISFDKVFQISLKALRRIV PLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALASQARK VINGVRRYVYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRDKREKAAAKFREY FPNFVGEPKSKDILKRLRYEQHGKCLYSGKEINLGRLEKGYVEIDHALPFSRT WDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFRS KKQRILLQKFDDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGGKRVFASN GQITNLLRGFWGLRKRVAENDRRHHALDAVVVACSTVAMQKQITFRVYKEMN AFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPPWEFFAQEVMIKRVFGKPDGKPEFEEADTPEK LRTLLAEKLSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARKLDEGVS VLRVPLTQLKLDLEKMNREPERKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKY DKAGNRTQQVKA V RVEQVQK TG VVVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYY LVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKA RMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFKQYQIDELGKEI RPCRLKKRPPVR</p>	20
<p><i>B. longum</i> Cas9</p> <p>配列番号 21</p>	<p>MLSRQLLGASHLARVSYSYNVQDNDVHCSYGERCFMRGKRYRIGIDVGLNSV GLAAVEVSDENSPVRLNLAQSVIHDGGVDPQKNKEAITRKNMSGVARRTRRM RRRKRERLHKLDMLLGKFGYPVIEPESLDPFEWHVRAELATRYIEDDELRE SISIALRHMARHRGWRNYPYRQVDSLISDNPSYKQY GELKEKAKAYNDATAAE EESTPAQLVVAMLDAGYAEAPRLRWRTGSKKPAEGYLPVRLMQEDNANELK QIFR VQRVPADEWKPLFRSVFYAVSPKGSAEQRVGQDPLAPEQARALKASLAF QEYRIANVITNLRKIDASAELRKLTVDEKQSIYDQLVSPSEEDITWSDLCDFLGF KRSQKGVGSLTEDGEERISSRPPRLTSVQRIYESDNKIRKPLVAWWSASDNE HEAMIRLLSNTVDIDKVREDVAYASAIEFIDGLDDDALTCLDSVDLPSGRAAYS VETLQKLTRQMLTDDDDLHEARKTLFNVTDSWRPPADPIGEPLGNPSVDRVLK NVNRYLMNCQQRWGNPVSVNIEHVRSSFSSVAFARKDKREYEKNNNEKRSIFRS SLSEQLRADEQMEK VRESDLRRLEAIQRQNGQCLYCGRTITFRTECMDHIVPRK</p>	30
		40

	<p>GVGSTNTRTNFAAVCAECNRMKSNTPF AI W ARSEDAQTRGVS LAEAKKRVTM FTFNPKSY APREVK AFKQAVIARLQQTEDDAAIDNRSIESVAWMADELHRRID WYFNAKQYVNSASIDDAEAETMKT TVSVFQGRVTASARRAAGIEGKIHFIQQQ SKTRLDRRHHA VDASVIAMMNTAAAQTLMERESLRESQR LIGLMPGERSWKE YPYEGTSRYESFHLWLDNMDVLELLNDALDNDRIA VMQSQR Y VLGN SIAHD ATIHPLEK VPLGSAMSADLIRRASPALWCALTRLPDYDEKEGLPEDSHREIRV HDTRY SADDEMGFFASQAAQIAVQEGSADIGSAIHARVYRCWKTN AKGV RK YFYGMIRVFQTDLLRACHDDLFTVPLPPQISMRYGEP RVVQALQSGNAQYL G SLVVGDEIEMDFSSLDV DGGI GEYLQFFSQFSGGNLAWKHVVVDGFFNQTLR IRPRYLA AEGLAKAFSDDV VPDGVQKIVTKQGWLPPVNTASKTAVRIVRRNAF GEPRLSSAHMPCSWQWRHE</p>
<p><i>A. mucimiphila</i> Cas9 配列番号 22</p>	<p>MSRSLTFSFDIGYASIGWAVIASASHDDADPSVCGCGTVLFPKDDCQAFKRREY RRLRRNIRSRRVRIERIGRLLVQAQIITPEMKETSGHPAPFYLA SEALKGHRTLAP IELWHVLRWYAHNRGYDNNASWSNLS SEDGGNGEDTERVKHAQDLMDKHGT ATMAETICRELKLEEGKADAPMEVSTPAYK NLNTAFPRLIVEKEVRRILELSAPL IPGLTAEI ELIAQHHP LTTEQRGVLLQHGIKLARRYRGSLLFGQLPRFDNRIISR CPVTWAQVYEAELKKGNSEQSARERAEKLSKVPTANCP EFY EYRMARILCNIR ADGEPLSAEIRRELMNQARQEGKLT KASLEKA ISSRLGKETETNVS NYFTLHPD SEEALYLNPAVEV LQRSGIGQILSPSVYRIAANRLRRGKSVTPNYLLNLLKSRGE SGEALEKKIEKESKKKEADYADTPLKPKYATGRAPYARTV LKKVVEEILDGEDP TRPARGEAHPDGELKAHDGCLYCLLD TDSSVNQHOKERRLDTMTN NHLVRHR MLILDRLLKDLIQDFADGQKDRISRVCVEVGKELTTF SAMSCKKI QRELTLRQK SHTDAVNRLKRKLP GKALSANLIRK CRIAMD MNWTCPTGATYGDHELENLEL EHIVPHSFRQSNA LSSLVTPWG VNRMKGORTGYDFVEQE QENPVDPKNLHI CSLN NYRELVEKLDDKKGHEDDRRRKKR KALLMVRGLSHKHQSQNH EAMK EIGMTEGMMTQSSHLMKLACKSIKTSLPDAHIDMIPGAVTA EVRKAWD VFGVF KELCPEAADPDSGKILKENLRSLTHLH HALDACVLGLPIY IIPAHNGLRRLVLA MRRRIPEKLIPQVRPVANQRHYVLNDDGRMMLRDL SASLKENIREQLMEQRVIQ HVPADMGGALLK ETMQRVLSVDGSGEDAMVSLSKKKDGKKEKNQVKASKLV GVFPEGPSKLKALKAAEIDGNYGVALDPKPVVIRHIK VFKRIMALKEQNGGPK VRILKKGMLIH LTSSKDPKHAGVWRIESIQDSKGGVKL DLQRAHCAVPK NKT H ECN WREV DLISL LK K YQMK RYPTSYTGTPR</p>
<p><i>O. lanens</i> Cas9 配列番号 23</p>	<p>METTLGIDLGTNSIGLALVDQEEHQILYSGVRIFFPEGINKDTIGLGEKEESRNATR RAKQMRQYFRKLRKAKLELLIAYDMCPLKPEDVRRWKNW DKQQKSTV RQFPDTPAFREWLKQNPYELRKQAVTEDVTRPELGRILYQMIQRRGFLSSRK GK EEGKIF TGKDRMVGIDE TRKNLQKQTLGAYLYDIAPKNGEKYRFRTERVRARY TLRDMYIREFEI IWQRQAGHLGLAHEQATRKNIFLEGSATNVRNSKLITHLQA KYGRGHVLI EDTRITVTFQLPLKEV LGKIEIEEQLKFKSNESV LFWQRPLRSQ KSLLSKCVFEGRNFYDPVHQK WIIAGPTPAPLSHPEFEFRA YQFINNIIYGKNEH LTAIQREAVFELMCTESKDFNF EKIPKHLKLFEKFNFD DTTKVPACTTISQLRKL FPHPVWEEKREEIWHCFYFYDDN TLLFEKLQKDYALQTNDLEKIKIRLSESYG NVSLKAIRINPYLKKGYAYSTAVLLGGIRNSFGKRFEYFKE YEPEIEKA VCRIL KEKNAEGEVIRK IKDYL VHNRFGFAKNDR AFQKLYHHSQA ITTQAQKERLPET GNLRNPVQQGLNELRRTVNKLLATCREKYGPSFKFDH IHVEMGRELRSSKTER EKQSRQIRENEKKNEAAKVKLAEYGLKAYRDNIQK YLLYKEIEEKG GTVCCPY TGKTLNISHTLGSDNSVQIEHIIPYSISLDDSLANKTLCDATFNREK GELTPYDFY QKDPSEK WGASSWEEIEDRAFRLLPYAKAQRFIRK PQESNEFISRQLNDTRYI SKKAVEYLSAICSDVKAFPGQLTALRHLWGLN N ILSAPDITFPLPVSA TENHR EYYVITNEQNEVIRLFPKQGETPRTEKGELLLTGEVERK VFRCKGMQEFQTDVS DGKYWRRIKLSSSVTWSPLFAPK PISADGQIVLKGRIEKGVFCNQLKQKLTG LPDGSY WISLPVISQTFKEGESVNNSKLSQVQV LFGRVREGIFRCHNYQCPASG ADGNFWCTLD TDAQAFTPIKNAPPVGGGQI L TGDVDDKGIFH ADDDLH YE LPASLPKGYGIFTVESCDPTLPIELSA PKTSKGENLIEGNIWVDEHTGEVRFD PKKNREDQRHHAIDAIVIALSSQSLFQRLSTYNARRENKGRGLDSTEHFSPWP</p>

10

20

30

40

	GFAQDVRQSVVPLLVSYKQNPCTLCKISKTLTKYKDGKKIHSCGNAVRGQLHKET VYGQRTAPGATEKSYHIRKDIRELKTSHIGKVVDITIRQMLLKHLQENYHIDIT QEFNIPSNAFFKEGVYRIFLPNKHGEPVPIKKIRMKEELGNAERLKDNNQYVNP RNNHHVMIYQDADGNLKEEIVSFWSVIERQNGQPIYQLPREGRNIVSILQINDT FLIGLKEEPEVYRNDLSTLSKHLRYRVQKLSGMYTFRHHLASTLNNEREEFRI QSLEAWKRANPVKVQIDEIGRITFLNGPLC
--	--

10

【0094】

いくつかの実施形態では、dCasエンドヌクレアーゼをコードする核酸配列は、コドン最適化dCasである。コドン最適化配列の例は、この事例において、非限定的に、真核生物、動物、および/または哺乳動物、例えばヒトにおける発現について最適化された（すなわち、ヒトでの発現について最適化された）配列である；例えば、国際公開第2014/093622号パンフレット（本明細書において参考としてそのまま組み込まれている）のSaCas9ヒトコドン最適化配列を参照。

20

【0095】

いくつかの実施形態では、本明細書に提示されるシステムで使用されるdCasエンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼが、その対応する野生型Casエンドヌクレアーゼと比較して、切断活性を欠く、または切断活性を実質的に欠くようにする変異を含むCasエンドヌクレアーゼのバリエーションである。例えば、国際公開第2017/091630号パンフレット（参照により本明細書にそのまま組み込まれている）を参照すると、本明細書で開示される1つの実施形態では、Cas9活性部位（10および840）において、アラニンへの変異（D10AおよびH840A）を生じさせることにより、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）Cas9の切断活性を除去し、ヌクレアーゼ欠損型または不活性型Cas9（すなわち、dCas9）を生成することができる。Ruvcドメインは、dCas9一次構造（残基1～60、719～775、および910～1099）の3つの非連続部分に分布している。Recローブは、残基61～718から構成される。HNHドメインは、残基776～909から構成される。PAM-IDドメインは、残基1100～1368から構成される。RECローブは、sgRNAおよび標的DNA/RNAを認識するための構造的なスキフォールドと考えられ得る。NUCローブは、2つのヌクレアーゼドメイン（HNHおよびRuvc）に加え、任意選択的なPAM配列を認識するPAM-相互作用ドメイン（PAM-ID）を含有する。この先行する研究では、例えば、非限定的に、約98個のヌクレオチドからなるsgRNAは、2つの主要な構造的コンポーネントに一般的に分割される：第1は、標的的特異的ガイドまたは「スペーサー」セグメント（ヌクレオチド1～20）に加え、リピート-テトラループ-アンチリピートおよびステムループ1（SL1）領域を含有する；第2は、ステムループ2および3（SL2、SL3）を含有する。したがって、ガイド～SL1 RNAセグメントには、Cas9 RECローブが主に結合し、そしてSL2～SL3セグメントには、NUCローブが主に結合する。

30

40

【0096】

本明細書で開示されるシステムで使用されるdCas9のいくつかの実施形態では、高い親和性を有して標的RNA配列を認識する、最低限度の（すなわち、できる限り少ないヌクレオチド塩基対を用いて）Cas9のコンストラクトが工学的に作出される。いくつかの実施形態では、dCas9をコードする最小のコンストラクトは、RECのみのコンストラクトである。いくつかの実施形態では、コンストラクトは、HNH、PAM-ID

50

、各ドメインの一部を欠いている、各ドメインの両方を欠いている、それほどには最低限に抑えられていないコンストラクト、またはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、HNHドメインは、残基775と909の間に5残基可動性リンカーを挿入することにより切除される()。いくつかの実施形態では、PAM-IDの全部または一部が除去される。いくつかの実施形態では、残基1098においてCas9をターゲットすること(PAM-ID#1)、残基1138および1345を8残基リンカーと融合させること(PAM-ID#2)、または残基1138を1200と残基1218を1339と融合させること(5残基リンカーおよび2残基リンカーをそれぞれ用いて:PAM-ID#3)が、PAM-IDの全部または一部を除去するのに使用される。PAM-ID#2および#3コンストラクトは、sgRNAリピート-アンチリピート(残基1099~1138)、およびSL2~SL3(残基1200~1218および残基1339~1368)セグメントの結合に寄与するPAM-IDの要素を保持する。いくつかの実施形態では、HNH欠損は、3つのPAM-ID欠損と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、国際公開第2016/19655号パンフレット(参照として本明細書にそのまま組み込まれている)に記載の、ヌクレアーゼ活性および/または切断活性を欠くまたは実質的に欠くCas9バリエーションは、本明細書で開示される組み換え発現系で使用されるdCas9の例である。

【0097】

したがって、本明細書で開示される組み換え発現系で使用されるのは、dCas-ADARデアミナーゼドメイン融合タンパク質をコードする核酸配列である。1つの実施形態では、dCas9は、触媒的に活性なADARデアミナーゼドメインに融合している。そのようなシステムの文脈において、対応する延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)が、標的RNAのアデノシンを標的とし、編集するのに使用される。システムは、リボヌクレオチド塩基修飾を行って、RNA分子の配列が細胞機構により認識される様式を変化させる能力を有するエフェクターデアミナーゼ酵素を含む組み換えタンパク質を生成する。1つの実施形態では、dCasおよびADARデアミナーゼドメインは、リンカーにより分離している。別の実施形態では、リンカーは、非限定的に、隣接したタンパク質ドメインを隔離するのに使用される可動性リンカーであるXTENリンカーである。XTENリンカーは当技術分野において公知であり、また例えば、国際公開第2013/130684号パンフレット(本明細書において参考として本明細書にそのまま組み込まれている)に見出され得る。

【0098】

RNA編集は、RNA内に軽微な改変を引き起こすことにより、所与の配列の遺伝子産物について、その多様性を増大させる天然プロセスである。一般的に、改変は、ゲノムによりコードされるRNA配列とは異なるRNA配列をもたらす、アデノシン(A)からイノシン(I)への変換と関係する。RNAの改変は、ADAR酵素により一般的に保証され、それによってプレRNA標的が、編集対象となるアデノシンを含有するエクソンと非コード領域のイントロン要素の間で塩基対形成することにより、不完全二本鎖RNAを形成する。古典的なA-I編集の例は、グルタミン酸レセプターGluR-B mRNAであり、それによって生じた変化が、チャンネルのコンダクタンス特性の改変を引き起こす(Higuchi M, et al. Cell. 1993;75: 1361-70)。

【0099】

本開示の目的に照らせば、ADAR(RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ)デアミナーゼドメインは、ADAR1、ADAR2、またはADAR3デアミナーゼドメインであり得る。Nishikura, K. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. Nat Rev Mol Cell Biol 17, 83-96, doi: 10.1038/nrm.2015.4 (2016)を参照。

【0100】

いくつかの実施形態では、ADARデアミナーゼドメインは、ADAR1(Uniprot P55265)の全部または一部に由来する。ADAR1の非限定的な代表的配列が下記(配列番号24)に提示される:

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

【 表 2 】

MAEIKEKICDYLFNVSDSSALNLAKNIGLTKARDINAVLIDMERQGDVYRQGTTPPI
 WHLTDKKRERMQIKRNTNSVPETAPAAIPETKRNAEFLTCNIPTSNASNNMVTTEKV
 ENGQEPVIKLENRQEARPEPARLKPVVHYNGPSKAGYVDFENGQWATDDIPDDLNSI
 RAAPGEFRAIMEMPSFYSHGLPRCSPYKKLTECQLKNPISGLLEYAQFASQTCEFNM
 EQSGPPHEPRFKFQVVINGREFPPAEAGSKKVAKQDAAMKAMTILLEEAKAKDSGK
 SESSHYTEKESEKTAESQTPTPSATSFSGKSPVTTLLECMHKLGNLSCEFRLLSKEG
 PAHEPKFQYCVAVGAQTFFPSVSAPSKKVAKQMAAEEAMKALHGEATNSMASDNQP
 EGMISESLDNLESMPNKVRKIGELVRYLNTNPVGGLEYARSHGFAAEFKLVDQS
 GPPHEPKFVYQAKVGGRWFPVCAHSHKQKQEAADAALRVLIGENEKAERMGFT
 EVTPVTGASLRRTMLLLSRSPAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCFNLTNSFQPSLL
 GRKILAAIIMKKDSEDMGVVSLGTGNRCVKGDSLKGETVNDCHAEIISRGFIRF
 LYSELMKYNSQTAKDSIFEPKGGKELQIKKTVSFHL YISTAPCGDGALFDKSCSDRA
 MESTESRHYPVFENPKQGLRRTKVENGEGETIPVSSDIVPTWDGIRLGERLRTMSCSD
 KILRWNVLGLQGALLTHFLQPIYLKSVTLGYLFSQGHLTRAIICRVTRDGSFEDGLR
 HPFIVNHPKVGRVSIYDSKRQSGKTKETSVNWCLADGYDLEILDGTRGTVDGPRNEL
 SRVSKKNIFLLFKKLCFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAKNYFKKGLKDMGYG
 NWISKPQEEKNFYLCPV

10

20

【 0 1 0 2 】

いくつかの実施形態では、ADARデアミナーゼドメインは、ADAR2 (UniProt P78563) の全部または一部に由来する。ADAR2 の非限定的な代表的配列が下記 (配列番号 25) に提示される：

30

【 0 1 0 3 】

40

50

【表 3】

MDIEDEENMSSSSSTDVKENRNLDNVSPKDGSTPGPGEGSQLSNGGGGGPGRKRPLEE
 GSNGHSKYRLKRRKTPGPVLPKNALMQLNEIKPGLQYTLLSQTGPVHAPLFFVMSV
 EVNGQVFEGSGPTKKKAKLHAAEKALRSFVQFPNASEAHLAMGRTL SVNTDFTSDQ
 ADFPDTL FNGFETPDKAEPFFYVGSNGDDSFSSSGDLSLSASPVPASLAQPPLPVLPPF
 PPPSGKNPVMILNELRPGLKYDFLSESGESHAKSFVMSVVVDGQFFEGSGRNKKLAK
 ARAAQSALAAIFNLHLDQTPSRQPIPSEGLQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFS
 SPHARRKVLAVVMTTGTVDKDAKVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISR
 RSLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHL YISTSPCGDARIFSP
 HEPIL EEPADRHPNRKARGQLRTKIESGEGTIPVRSNASIQTWGVLQGERLLTMSCS
 DKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHL SRAMYQRISNIEDLPPLYTLN
 KPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYC
 RWMRVHGVKVP SHLLRSKITKPNVYHESKLA AKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVE
 KPTEQDQFSLTP

10

20

【0104】

いくつかの実施形態では、ADARデアミナーゼドメインは、ADAR3(Uniprot Q9NS39)の全部または一部に由来する：ADAR2の非限定的な代表的配列が下記(配列番号26)に提示される：

【0105】

【表 4】

MASVLGSGRGSGLSSQLKCKSKRRRRRRSKRKDKVSILSTFLAPFKHLSPGITNTED
 DDTLSTSSAEVKENRN NVGNLAARPPPSGDRARGGAPGAKRKRPLEEGNGGHLCKLQ
 LVWKKLSWSVAPKNALVQLHEL RPGLQYRTVSQTGPVHAPVFAVAVEVNGLTFEG
 TGPTKKKAKMRAAELALRSFVQFPNACQAHLAMGGGGPGPGTDFTSDQADFPDTLFQ
 EFEPAPRPGLAGGRPGDAALLSAA YGRRRLLCRALDLVGPTPATPAAPGERNPVVL
 LNRLRAGLRYVCLA EPAERRARSFVMAVSVDGRTFEGSGRSKKLARGQAAQAALQ
 ELFDIQMPGHAPGRARRTPMPQEFADSI SQLVTQKFREVT TDLTPMHARHKALAGIV
 MTKGLDARQAQVVALSSGTKCISGEHLS DQGLVVNDCHAEVVARAFLHFLYTQLE
 LHL SKRREDSERSIFVRLKEGGYRLRENILFHL YVSTSPCGDARLHSPYEIT TDLHSSK
 HLVRKFRGHLRTKIESGEGTVPVRGPSAVQTWDGVLLGEQLITMSCTDKIARWNVL
 GLQGALLSHFVEPVYLQSI VVGSLHHTGHLARVM SHRMEGVGQLPAS YRHNRPLLS
 GVSDAEARQPGKSPPF SMNWVVG SADLEIINATTGRRSCGGPSRLCKHVL SARWAR
 LYGRLSTRTPSPGDTPSMYCEAKLGAHTYQSVKQQLFKAFQKAGLGTWVRKPPEQQ
 QFLLTL

30

40

【0106】

いくつかの実施形態では、ADARドメインは、野生型ADARドメインと比較して、触媒活性の増加を引き起こす変異を含み得る。いくつかの実施形態では、触媒的に活性なデアミナーゼドメイン(DD)は、野生型ヒトADAR2 DD、または酵素活性および

50

RNA 基質に対する親和性を増加させる変異 (E488Q) を担持するヒト ADAR2 DD に由来する (Phelps et al., Jan 2015, Nuc. Acid Res., 43(2): 1123-1132; Kuttan & Bass, Nov 2012, PNAS 109(48): E3295-E3304)。

【0107】

ADAR2 の触媒ドメインは、その RNA 認識モチーフとは独立して、dsRNA 領域内の対応する塩基がないアデノシン残基を脱アミノ化するのが好ましいので、出願者らは、本明細書で開示されるシステムのシングルガイド RNA (sgRNA) コンポーネントの構造を改変して、基質特異性をヌクレオチド分解能まで向上させた。補足的な 3' 末端カセットを用いて工学的に操作された gRNA は、生細胞内でその標的能力を維持することが報告された (Konermann et al. Jan 2015, Nature, 517: 583-588)。

10

【0108】

出願者らは、所望の編集部位において標的 RNA と塩基対形成する能力を有する追加の相同性の領域を含むシステムの sgRNA 構造において、その戦略的改変に基づき、CRISPR/Cas 媒介式の RNA 編集 (CREDIT) プラットフォームを開発した。sgRNA 構造に対するそのような改変から、開示されるシステムの延長された sgRNA (すなわち、esgRNA) が生成し、その結果、標的転写物との間で A から C へのミスマッチが生じ、膨らんだアデノシンにおいて編集される「偽 dsRNA」基質が生成する (図 1A を参照)。したがって、本明細書で開示される CREDIT プラットフォームおよびシステムは、トランスクリプトーム内の実質的にすべてのアデノシンを標的としてイノシンへの変換 (すなわち、A-I RNA 編集) を誘発する能力を提供し、それは最終的に、翻訳機構およびスプライシング機構によりグアノシンとして読み取られる。

20

【0109】

その全体的なデザインの単純性ならびにその完全にコーディング可能な性質に起因して、本明細書で開示される組み換え発現系は、その他の類似した RNA 改変システムおよび方法と比較したときに、高度の有用性および工学汎用性を提供する。dCas9 は、sgRNA スキャフォールド配列に対してピコモルの親和性を有して結合するので、またこの改善したシステムは、標的親和性および特異性の両方を高めるために、延長されたシングルガイド RNA、すなわち esgRNA 構造に基づくデュアルガイドアーキテクチャを使用するので、オフターゲット編集イベントの可能性を最低限に抑えつつ、RNA の直接編集が効率的に実現される。いくつかの実施形態では、esgRNA は、i) スキャフォールド配列、および ii) 短鎖延長配列を用いて、ただしスペーサー配列を用いずに設計され得る。

30

【0110】

1 つの実施形態では、esgRNA は、i) ほぼ完璧な RNA-RNA 塩基対形成能力を有する相同性の領域 (すなわち、標的 RNA に対して相同性の短鎖延長配列)、および ii) dCas9 結合領域 (すなわち、スキャフォールド配列) の少なくとも 2 つの領域から構成される。1 つの実施形態では、短鎖延長配列は、標的トランスクリプトームとの間で A-C ミスマッチを形成し、そして膨らんだアデノシン残基において編集される「偽 RNA」基質を生成するミスマッチを含む。したがって、短鎖延長配列の相同性領域は、本明細書で開示される組み換え発現系の特異性を決定し、特に細胞トランスクリプトーム内のどの RNA 塩基が編集されるかを特異的に決定する。編集される RNA 塩基は、相同性領域内のミスマッチアデノシン残基および標的 RNA 二本鎖により区別される。図 1A を参照。短鎖延長配列の相同性領域およびスキャフォールドの配置には融通性がある。1 つの実施形態では、スキャフォールド配列は、esgRNA の 5' 末端に位置する。別の実施形態では、ほぼ完璧な RNA-RNA 塩基対形成能力を有する相同性領域を担持する短鎖延長配列は、esgRNA の 3' 末端に位置する。別の実施形態では、短鎖延長配列は、esgRNA の 5' 末端に位置する。本開示の目的に照らせば、「3' 末端」または「5' 末端」とは、esgRNA のいずれのシナリオにおいても、esgRNA の末端部分を指す。別の実施形態では、esgRNA は、第 3 の領域、iii) 標的 RNA に対して第 2 の相同性領域を含むスペーサー配列をさらに含む。1 つの実施形態では、スペーサー配列は

40

50

、スキャフォールド配列の5'末端に位置する。スペーサー配列は、標的RNAに対して相補的であるが、しかし標的RNAのA-I編集を有効にするのにミスマッチを必要としない。1つの実施形態では、スペーサー配列は、スキャフォールド配列の5'末端に位置する。別の実施形態では、短鎖延長配列は、スキャフォールド配列の3'末端、またはスペーサー配列の5'末端に位置する。別の実施形態では、短鎖延長配列は、esgRNAの末端部分に位置する。別の実施形態では、短鎖延長配列は、スペーサー配列と連続している。別の実施形態では、短鎖延長配列は、スペーサー配列と連続していない。別の実施形態では、esgRNAは3'から5'方向でi)~iii)を含む。

【0111】

いくつかの実施形態では、核タンパク質複合体が、シングルガイドRNA (sgRNA) 10
)、または本明細書に開示するように、延長されたシングルガイドRNA (esgRNA) と複合体形成する。いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAは、シングルガイドRNAまたはesgRNAスキャフォールド配列内の二次的構造の延長部(標的アデノシンを編集する能力を有するesgRNA内の相同性の短鎖延長配列以外の部分であり、それに付加して)を担持する。いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAは、転写終結配列、またはトランス作用性のヌクレアーゼの作用により転写後のシングルガイドRNA(またはesgRNA)を不安定化させる配列について、それを部分的または全面的に除去することにより、シングルガイドRNA(またはesgRNA)の発現レベルを改善する、1つまたは複数の点変異を含む。いく
20
つかの実施形態では、シングルガイドRNA(またはesgRNA)は、5'末端において、前記シングルガイドRNAまたはesgRNAを分解に対して安定化させる変更を含む。いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAは、5'末端においてRNA標的を改善する変更を含む。いくつかの実施形態では、前記シングルガイドRNAまたはesgRNAの5'末端における変更は、2'-O-メチルホスホロチオエートおよびチオホスホノアセテート結合および塩基からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAは、標的認識を改善するため、またはシングルガイドRNAまたはesgRNAに対するヌクレアーゼ活性を低下させるために、sgRNAまたはesgRNAのスペーサーまたはスキャフォールド領域内に2'-フッ化、2'-O-メチル、および/または2'-メトキシエチル塩基修飾を含む。いくつかの実
30
実施形態では、シングルガイドRNAは、標的RNAに対するヌクレアーゼ活性を低下させる1つまたは複数のメチルホスホネート、チオホスホノアセテート、またはホスホロチオエート結合を含む。

【0112】

いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAは、例えば標的RNAにハイブリダイズすることにより標的RNAを認識することができる。いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAは、標的RNAに対して相補的な配列を含む。いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAは、10nt、20nt、30nt、40nt、50nt、60nt、70nt、80nt、90nt、100nt、110nt、120nt、130nt、140nt、150nt、160nt、170nt、180nt、190nt、200nt、300nt、400nt、500nt、1,000nt、2,000ntにほぼ等しい、それ未満、もしくはそれを超える長さ、または上記数値の任意の2つに挟まれる範囲内の長さを有する。いく
40
つかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAは、1つまたは複数の改変されたヌクレオチドを含み得る。

【0113】

さらなる実施形態では、様々なRNA標的が、シングルガイドRNAまたはesgRNAにより認識可能である。例えば、標的RNAは、メッセンジャーRNA(mRNA)、リボソームRNA(rRNA)、シグナル認識粒子RNA(SRP RNA)、トランスファーRNA(tRNA)、小核RNA(snRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA)、アンチセンスRNA(aRNA)、長鎖非コーディングRNA(lncRNA) 50

、マイクロRNA (miRNA)、piwi相互作用性RNA (piRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、レトロトランスポゾンRNA、ウイルスゲノムRNA、ウイルス非コーディングRNA等であり得る。いくつかの実施形態では、標的RNAは、病状、例えばがん、神経変性、皮膚の病状、内分泌の病状、腸の疾患、感染性の病状、神経障害、肝疾患、心臓障害、自己免疫疾患等に関する病因または治療目標に関与するRNAであり得る。

【0114】

さらなる実施形態では、標的RNAの代表的なGからAへの変異、および治療の対象となる対応する疾患、病状、および/または症候群は、非限定的に下記の通りである。

傍神経節腫、胃間質肉腫、傍神経節腫4、クローム親和細胞腫、傍神経節腫1、および/または遺伝性のがん易罹患性症候群を治療するためのSDHB (コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体 - 鉄硫黄サブユニットB) ;

10

ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損、ヒルシュスプルング病1、フルオロウラシル応答性、ピリミジン類似体応答性 - 毒性 / ADR、カペシタビン応答性 - 毒性 / ADR、フルオロウラシル応答性 - 毒性 / ADR、および/またはテガフル応答性 - 毒性 / ADRを治療するためのDPYD (ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ) ;

リンチ症候群、腫瘍素因症候群、および/またはターコット症候群を治療するためのMSH2 (mutSホモログ2) ;

リンチ症候群を治療するためのMSH6 (mutSホモログ6) ;

三好型筋ジストロフィー1、および/または肢帯筋ジストロフィー2B型を治療するためのDYSF (ジスフェリン) ;

20

幼児期における重度ミオクローヌステんかんを治療するためのSCN1A (ナトリウム電位作動型チャンネル サブユニット1) ;

原発性拡張型心筋症を治療するためのTTN (チチン) / TTN - AS1 ;

フォン・ヒッペル・リンドウ症候群; および/または遺伝性のがん易罹患性症候群を治療するためのVHL (フォン・ヒッペル・リンドウ腫瘍抑制因子) ;

リンチ症候群、遺伝性のがん易罹患性症候群、および/または腫瘍素因症候群を治療するためのMLH1 (mutLホモログ1) ;

網膜色素変性および/または網膜色素変性40を治療するためのPDE6B (ホスホジエステラーゼ6B) ;

30

虫部の家族性形成不全および/またはジュベール症候群9を治療するためのCC2D2A (コイルドコイルおよびC2ドメインを含有する2A) ;

潜在眼球症候群を治療するためのFRAS1 (フレイザー細胞外マトリックス複合体サブユニット1) ;

不整脈惹起性の右室心筋症8型および/または心筋症を治療するためのDSP (デスマブラキン) ;

リンチ症候群および/または腫瘍素因症候群を治療するためのPMS2 (PMS1ホモログ2、ミスマッチ修復システムコンポーネント) ;

アルギニノコハク酸尿症を治療するためのASL (アルギニノコハク酸リアーゼ) ;

大動脈弁上狭窄症を治療するためのELN (エラスチン) ;

40

前庭水管拡大症候群および/またはペンドレッド症候群を治療するためのSLC26A4 (溶質輸送体ファミリー26メンバー4) ;

嚢胞性線維症を治療するためのCFTR (嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子) ;

色覚障害3を治療するためのCNGB3 (環状ヌクレオチド感受性チャンネル 3) ;

ファンコーニ貧血および/または遺伝性のがん易罹患性症候群を治療するためのFANCC (ファンコーニ貧血相補群C) - C9orf3 ;

遺伝性のがん易罹患性症候群、バナヤン・ライリー・ルバルカバ症候群、カウデン病、乳がん、自閉症スペクトラム障害、頭頸部扁平上皮癌、肺がん、および/または前立腺がんを治療するためのPTEN (ホスファターゼおよびテンシンホモログ) ;

肢帯筋ジストロフィー2L型、顎骨骨幹異形成症、三好型ミオパチー、および/または

50

三好型筋ジストロフィー 3 を治療するための A N O 5 (アノクタミン 5) ;

一次性家族性肥大型心筋症を治療するための M Y B P C 3 (ミオシン結合タンパク質 C、心臓) ;

家族性孤立性の副甲状腺機能亢進症、複数の内分泌新生物、原発性大結節性副腎過形、および/または腫瘍を治療するための M E N 1 (メニン 1) ;

運動失調末梢血管拡張症候群、および/または遺伝性のがん易罹患性症候群を治療するための A T M (A T M セリン/トレオニンキナーゼ) および/または A T M - C 1 1 o r f 6 5 ;

不整脈惹起性の右室心筋症 9 型および/または不整脈惹起性の右室心筋症を治療するための P K P 2 (プラコフィリン 2) ;

フェニルケトン尿症を治療するための P A H (フェニルアラニンヒドロキシラーゼ) ;

聴覚消失、常染色体劣性 1 A、非症候群性遺伝性聴覚消失、および/または聴覚障害を治療するための G J B 2 (ギャップ結合タンパク質 2) ;

ピーターズプラス症候群を治療するための B 3 G L C T (3 - グルコシルトランスフェラーゼ) ;

家族性の乳房のがん、乳房 - 卵巣がん - 家族性 2、遺伝性のがん易罹患性症候群、ファンコーニ貧血、相補群 D 1、遺伝性の乳房および卵巣がん症候群、遺伝性のがん易罹患性症候群、乳房 - 卵巣がん - 家族性 1、および/または遺伝性の乳房および卵巣がん症候群を治療するための B R C A 2 (B R C A 2、DNA 修復関連) ;

原発性拡張型心筋症、心筋症、および/または心筋症 - 左室緻密化障害を治療するための M Y H 7 (ミオシン重鎖 7) ;

マルファン症候群を治療するための F B N 1 (フィブリリン 1) ;

テイ・サックス病を治療するための H E X A (ヘキササミニダーゼサブユニット A) ;

結節性硬化症 2、および/または結節性硬化症候群を治療するための T S C 2 (T S C 複合体サブユニット 2) ;

ルピンシュタイン・テイビ症候群を治療するための C R E B B P (C R E B 結合タンパク質) ;

遺伝性びまん性胃がん、腫瘍素因症候群、および/または遺伝性のがん易罹患性症候群を治療するための C D H 1 (カドヘリン 1) ;

痙性対麻痺 7 を治療するための S P G 7 (S P G 7、パラプレギンマトリックス A A A ペプチダーゼサブユニット) ;

乳房 - 卵巣がん - 家族的性 1、遺伝性の乳房および卵巣がん症候群、および/または遺伝性のがん易罹患性症候群を治療するための B R C A 1 (B R C A 1、DNA 修復関連) ;

家族性の乳房のがんおよび/または腫瘍素因症候群を治療するための B R I P 1 (B R C A 1 相互作用性タンパク質 C 末端ヘリカーゼ 1) ;

家族性高コレステロール血症および/または高コレステロール血症を治療するための L D L R (低密度リポタンパク質受容体) および/または L D L R - M I R 6 8 8 6 ;

メープルシロップ尿症を治療するための B C K D H A (分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ E 1、ポリペプチド) ;

家族性の乳房のがん、乳房および結腸直腸がん - 感受性、および/または遺伝性のがん易罹患性症候群を治療するための C H E K 2 (チェックポイントキナーゼ 2) ;

ベッカー型筋ジストロフィー、デュシェンヌ筋ジストロフィー、および/または拡張型心筋症 3 B を治療するための D M D (ジストロフィン) ; ならびに/あるいは

ハーラー症候群、多発性骨形不全症、ムコ多糖症、M P S - I - H / S、および/またはムコ多糖症 I 型を治療するための I D U A (イズロニダーゼ、 - L)。

【 0 1 1 5 】

いくつかの実施形態では、e s g R N A は、長さ約 1 0 ~ 1 0 0 ヌクレオチドである、または長さ約 1 0、1 5 ~ 6 0、2 0 ~ 5 0、もしくは 2 5 ~ 4 0 である、またはその間の任意の範囲のヌクレオチドである標的 R N A に対して相同性の短鎖延長配列を含む。いくつかの実施形態では、e s g R N A の短鎖延長配列は、非限定的に、約 1 個のミスマッ

10

20

30

40

50

チ、または2、3、4、もしくは5個のミスマッチを含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAまたはesgRNAには、標的RNAと結合するまたはハイブリダイズする配列、例えばRNA認識が特異性によって支援され、そして独特の可動性を有するように、標的RNAに対して相同性の追加の領域を含むスペーサー配列等（本明細書で開示される相同性の短鎖延長配列に付加して）が非限定的に含まれ、アクセス可能なゲノム操作を提供する。本明細書において参照としてそのまま組み込まれる国際公開第2017/091630号パンフレットを参照。

【0117】

CFTR mRNA（嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子、Ref Seq: NM_000492）およびIDUA mRNA（イズロニダーゼ、Ref Seq: NM_000203）を標的とするesgRNA用として設計された非限定的な代表的スペーサー配列および延長配列は、下記の表に提示される：

【0118】

【表5】

標的	スペーサー配列	ADAR 延長配列
CFTR	gttcatagggatccaagttt (配列番号 43)	tttctccactgttgcaaag (配列番号 44)
IDUA	ccagcgcaccgccccag (配列番号 45)	acttcggcccagagctgctcc (配列番号 46)

【0119】

1つの実施形態では、本明細書で開示されるシステムは、単一のベクターに適合するヌクレオチド長まで最小化された核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターはAAVベクターである。AAVベクターは、サイズが約4.5kbである導入遺伝子をパッケージングする能力を有する。いくつかの事例では、例えば約4.6kb、4.7kb、4.8kb、4.9kb、5.0kb、5.1kb、5.2kb、5.3kb、5.4kb、5.5kb、5.6kb、5.7kb、5.8kb、5.9kb、6.0kb、6.1kb、6.2kb、6.3kb、6.4kb、6.5kb、6.6kb、6.7kb、6.8kb、6.9kb、7.0kb、7.5kb、8.0kb、9.0kb、10.0kb、11.0kb、12.0kb、13.0kb、14.0kb、15.0kb、またはそれ超等のより大きな導入遺伝子をパッケージングする能力を有するAAVベクターが使用される。

【0120】

別の実施形態では、本明細書で開示されるシステムは、非限定的に、システムコンポーネントの発現を駆動するための1つまたは複数のプロモーター配列を含む。小分子RNAを発現させるための代表的なプロモーターは、非限定的にポリメラーゼIIIプロモーター、例えばU6やH1等である。システムコンポーネントの発現を駆動するためのその他のプロモーターは、非限定的に、EF1（またはその短鎖、イントロンレス形態、EF5）、CAG（CMVエンハンサー、ニワトリ - アクチンプロモーター、およびウサギ - グロビンスプライスアクセプター部位の融合物）、ミニCMV（サイトメガロウイルス）、CMV、MCK（筋クレアチンキナーゼ）、MCK/SV40、デスミン、および/またはc512（グルタミン酸カルボキシペプチダーゼII）である。

【0121】

1つの実施形態では、組み換え発現系は、ベクター、例えばアデノ随伴ウイルス（AAV）により担持されるDNAにコードされ、そして下記の方法のうちの1つにより該当する組織に送達され得る：特異的な組織親和性を示す特異的なAAV血清型の使用（例えば

ニューロンまたは筋肉を標的とするAAV-9等)；RdCas9システムをコードするネイキッドDNAの組織、例えば筋肉または肝臓等への注射；脂質、ポリマー、または治療用組み換え発現系をコードするDNAまたはRNAを担持するその他の合成もしくは天然の物質から構成されるナノ粒子の使用；あるいは一方のウイルスがdCas9タンパク質-ADAR融合物をコードし、そして他方のウイルスがsgRNAをコードする；または一方のウイルスがdCas9タンパク質および/もしくはsgRNAをコードする一方、他方のウイルスが、ADARタンパク質および/もしくはsgRNAをコードするように、2つの異なるウイルスまたはDNA分子の間でシステムが分離されている上記方法のいずれか。CREDITのいくつかの部分が、異なるベクター上でコードされる複数の実施形態では、dCas9のコードされるいくつかの部分とADARは、機能的なdCas9-ADAR核タンパク質複合体が形成されるように相互作用することができる。代表的な分離システムは、Wright et al., Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. PNAS 112:2984-2989 (2015)に認めることができる(その内容は、本明細書により参照としてそのまま組み込まれている)。

10

【0122】

ヒト対象または動物の治療において、本明細書に提示されるような代表的な組み換え発現系を使用するために、ベクター系、例えばAAVの系が、例えば下記の方法により注射可能である：(1)骨格筋組織(筋肉内)、複数部位同時(関連する適応：筋緊張性ジストロフィー)-主要な筋肉群、例えば腹筋、二頭筋、三角筋、脊柱起立筋、腓腹筋、ヒラメ筋、殿筋、膝腱、広背筋、菱形筋、斜筋、胸筋、四頭筋、僧帽筋、および/または三頭筋等への注射1回当たり $10^{11} \sim 10^{14}$ GC(ゲノムコピー)の注射；(2)筋肉を標的とする標的AAV血清型、例えばAAV9またはAAV6等の静脈内送達-注射1回当たり $10^{11} \sim 10^{14}$ GCの注射で、合計 $10^{12} \sim 10^{17}$ GCが送達される；3.AAV6、AAV9、またはニューロン親和性を示す別の血清型の軟膜下脊髄注射-単回または多数回投与での $10^{11} \sim 10^{17}$ GCの注射；4.AAV6、AAV9、またはニューロン親和性を示す別の血清型の頭蓋骨内注射-単回または多数回投与での $10^{11} \sim 10^{17}$ GCの注射。

20

【0123】

その他の実施形態では、本明細書で開示される組み換え発現系は、当技術分野において公知の方法により処方化され得る。さらに、任意の投与経路、例えば経口、肺、腹腔内(ip)、静脈内(iv)、筋肉内(im)、皮下(sc)、経皮、パッカル、鼻腔、舌下、眼球、直腸、および膣腔を含む、ただしこれらに限定されない任意の従来式の投与経路等によることが想定され得る。さらに、神経系への直接投与は、ポンプデバイスを用いたまたは用いない、頭蓋骨内または脊椎内注射針またはカテーテルを経由する送達による脳内、脳室内、側脳室内、髄腔内、大槽内、脊髄内、または脊髄周辺の投与経路を含み得るが、ただしこれらに限定されない。本明細書に記載される治療効果を提供する任意の用量または投与頻度が、本治療で使用するのに適する。特定の実施形態では、対象には、本開示に基づく組み換え発現系をコードするウイルスベクターが筋肉内経路により投与される。1つの実施形態では、ベクターは、上記で定義したAAVベクターであり、AAV9ベクターである。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、ベクターの単回注射を受け得る。さらに、標準的な薬学的方法が、作用持続時間をコントロールするために採用され得る。これらは、当技術分野において周知されており、また放出コントロール型製剤を含み、そしてふさわしい高分子、例えばポリマー、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレン酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、または硫酸プロタミンを含み得る。さらに、医薬組成物は、本開示の組み換え発現系を含有するナノ粒子を含み得る。

30

40

【0124】

本明細書に記載されるような組み換え発現系、ベクター、細胞、またはウイルス粒子のうちの1つまたは複数、および担体を含む、それからなる、または実質的になる組成物も、本発明により提供される。いくつかの実施形態では、担体は薬学的に許容される担体で

50

ある。

【0125】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組み換え発現系は、任意選択的に、PAMmer オリゴヌクレオチドの追加投与、すなわち開示されるシステムと、対応するPAMmer との同時または連続した同時期の投与を含むことができる。PAMmer オリゴヌクレオチド配列に関する選択技術は当技術分野において周知されており、また例えば国際公開第2015/089277号パンフレット（参照として本明細書にそのまま組み込まれている）に見出され得る。PAMmer は、いくつかの事例では、RNA に対する dCas9 の *in vivo* ならびに *in vitro* での結合親和力を増加させ得るが、出願者らのこれまでの研究、国際公開第2017/091630号パンフレット（参照として本明細書にそのまま組み込まれている）では、RNA 認識および編集の実現において PAMmer は不要であることが驚くべきことに見出された。本明細書に記載の出願者らの送達戦略を単純化するため、および本明細書における開示システムを完全にコーディング可能なシステムとして維持するために、下記の実験を PAMmer の不存在下で実施した。この機構の概略を図1Aに要約する。

10

【0126】

本明細書に開示されるような組み換え発現系を使用する方法が、例えば狙いを定めた細胞RNA編集がプロセッシングおよび動力学に与える効果を特徴づけるための研究ツールとして本明細書で開示される。

【0127】

例えば、*in vivo* または *ex vivo* で RNA 編集するための組み換え発現系を送達して、そのような編集を必要とする疾患を治療するために、ウイルス(AAV)またはその他のベクターに基づく送達アプローチを使用することにより、本明細書に開示されるような組み換え発現系を疾患治療薬として使用する方法が、本明細書にさらに開示される。

20

【0128】

標的および関連疾患の非限定的な例として、未成熟終止コドンRNA疾患、例えばハーラー症候群、嚢胞性線維症、デュシェンヌ筋ジストロフィー等、ならびにRNA編集における欠陥と関連した疾患、例えばAMPAサブユニットGluA2のQ/R残基の過少編集が合併した興奮毒性のニューロン障害等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。興奮毒性は、脊髄損傷、脳卒中、外傷性脳損傷、聴覚消失（ノイズへの過剰暴露または聴器毒性による）、および中枢神経系(CNS)の神経変性疾患、例えば多発性硬化症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、アルコール中毒症またはアルコール離脱症候群、特に過急速ベンゾジアゼピン離脱症候群、およびハンチントン病等に関与し得る。

30

【実施例】

【0129】

下記の実施例は、本開示を有効に実施する際の様々な事例において使用可能である手順の非限定的および例証的な例である。さらに、本明細書において開示される下記参考資料のすべてが参考としてそのまま組み込まれている。

40

【0130】

1) 生細胞において、1塩基特異的レベルでレポーターmRNAコンストラクトを認識および編集し、および2) 生細胞において、eGFPレポーター転写物からの発現について、未成熟終止コドン(PTC)が媒介する発現停止を回復させる、出願者により生み出された組み換え発現系のプロトタイプについて以下に記載する(図1Cおよび図1Dを参照)。

【0131】

実施例1 CRISPR/Cas9の核送達による細胞RNAの狙いを定めた編集プラスミドの構築

dCas9-2xNLSをコードする配列を、pCDNA3.1-dCas9-2xN

50

LS-EGFP (Addgene プラスミド # 74710) からクローン化した。ADAR2-XTEN-dCas9 融合生成物の場合、XTENペプチドリンカーと融合したdCas9配列、およびADAR2触媒ドメイン(ヒトADAR2 ORFからPCR増幅した)を、ギブソン・アセンブリを使用してpCDNA3.1 (Invitrogen社)バックボーンに組み込んだ。dCas9部分を、dCas9-NLS配列に隣接するプライマーを使用して逆PCRにより除去し、ADAR2-XTEN融合物を生成した。ADAR2-XTEN-dCas9およびADAR2-XTENをテンプレートとしてそれぞれ使用して、PCR媒介式の部位特異的な変異誘発を実施し、ADAR2-XTEN-dCas9 E488QおよびADAR2-XTEN E488Q変異バリエーションを生成した。PCR増幅およびFastDigest HindIIIおよびNotI (Thermo Fisher社)を使用した制限酵素消化を通じて、すべての融合配列をpCDNA5/FRT/TO (Invitrogen社)にクローン化した。

10

【0132】

esgRNAバックボーンを構築するために、哺乳動物Ef1aプロモーター、mCherry ORF、およびBGHポリ(A)シグナルに関する配列を、U6ポリメラーゼIIIプロモーターにより駆動される改変されたsgRNAスキヤフォールド(Chen et al. 2013)を担持するpBlueScript IISK(+)(Agilent社)バックボーンにギブソン・アセンブルした。3'延長配列を担持するsgRNAそれぞれを、スペーサーおよび延長配列を担持するテールプライマーを使用して、改変されたsgRNAスキヤフォールドを増幅するPCR、ならびにU6プロモーターの下流に位置するpBlueScript IISK(+)-mCherryベクターにギブソン・アセンブルすることにより生成した。

20

【0133】

細胞系およびトランスフェクション

Flp-In T-REX293を、10%のウシ胎仔血清(Gibco社)が補充されたダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)内で培養した。TrypLE Express (Gibco社)を使用して、細胞を3~4日毎に継代し、そして5%のCO₂を含む組織培養インキュベーター中、37℃で維持した。

【0134】

安定でドキシサイクリン誘導可能な系統を、10cmの組織培養皿上に細胞を播種し、そしてポリエチレンイミン(PEI)を使用しながら、60~70%の集密度で、FlpリコンビナーゼをコードするpOG44(9µg)(Invitrogen社)と共に、ADAR2融合コンストラクトを担持するpCDNA5/FRT/TO(1µg)を用いて同時トランスフェクトすることにより生成した。その後、細胞を25%の集密度まで継代し、そして48時間後に、5µg/mlのプラストサイジンおよび100µg/mlのハイグロマイシンB(Gibco社)を用いて選択した。個々のハイグロマイシン耐性コロニーが識別されるまで、細胞を選択条件下に留め、そして8~10個のコロニーを増殖およびバリデーション用に取り出した。

30

【0135】

トランスフェクションに先立ち、トランスフェクション当日の24時間前に、細胞0.1×10⁶個を24ウェルプレート上に播種し、そしてドキシサイクリンと共に、1µg/mlの最終濃度で24時間プレインキュベートした。細胞を、次にリポフェクトアミン3000(Invitrogen社)を使用しながら、350µgのW58X変異体またはWTeGFPレポーターコンストラクト(Stafforst Labからの寄贈)と共に、150µgの各sgRNA-mCherryコンストラクトを用いて同時トランスフェクトした。トランスフェクション後、画像検査およびFACS分析の前に、細胞をドキシサイクリン誘発条件下で48時間保持した。Zeiss蛍光顕微鏡を使用して、20×倍率で画像を撮影した。

40

【0136】

フローサイトメトリー分析

50

標準的なプロトコールを使用して、細胞をTrypLE Expressにより解離した。細胞を次に5%のFBSが補充された1×DPBS (Corning社)中で再懸濁し、35 μmのナイロンセルストレーナーに通過させ、そしてLSRFortessaまたはAccuri装置 (BD社)を使用してフローサイトメトリー分析を行った。細胞を適切に篩い分けし、そしてGFP (FITC) 蛍光について分析した。トランスフェクション効率について標準化するために、W58XeGFPトランスフェクション集団に由来するGFP陽性細胞の割合を求め、そしてWT eGFPレポーターにより代わりにトランスフェクトしたときのGFP陽性細胞の割合で割り算することにより、融合物 - esgRNAの対毎に補正後のパーセントeGFPの個々の数値を算出した。FACS分析を、FlowJoソフトウェアを使用して行い、そしてGraphpad Prism6を使用してコンパイル後の結果をプロットした。

10

【0137】

考察

これらの実験では、非限定的に、上記組み換え発現系は、A) ヒトADAR2タンパク質の触媒性デアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型Cas9 (dCas9) タンパク質をコードする核酸配列、およびB) U6ポリメラーゼIIIプロモーターにより駆動される延長されたシングルガイドRNA (esgRNA) 配列を含む。該当するトランスフェクション試薬を用いて、システムを哺乳動物細胞の核に送達したが、RCas9-RNA認識複合体を形成した後、配列は標的mRNAと結合し、それを編集する。これは、標的アデノシン残基が、細胞機構によりグアノシンとして認識されるイノシンに脱アミノ化されるという、選択的RNA編集を可能にする。

20

【0138】

上記システムにおいて記載される触媒的に活性なデアミナーゼドメイン (DD) は、野生型ヒトADAR2、または野生型ヒトADAR2と比較して、RNA基質に対する酵素活性および親和性を増加させる変異 (E488Q) を担持するヒトADAR2 DDのいずれかである。DDを、そのC末端において半可動性XTENペプチドリンカーに融合させ、次にそのN末端においてdCas9に融合させた (図1B)。RNA認識非依存性のバックグラウンド編集をコントロールするために、dCas9部分を欠いている融合コンストラクトも作成した (AX、AX-488Q)。

【0139】

esgRNAコンストラクトを、所望の編集部位においてほぼ完璧なRNA-RNA塩基対を形成する能力を有する相同性の領域を含め改変した。相同性領域は標的アデノシンのミスマッチを含み、A-Cミスペアリングを生じさせ、そして標的転写物上に「偽dsRNA」基質を生成する (図1A)。これは、プログラム可能なRNA基質認識、ならびに同時塩基特異的脱アミノ化の手段を生み出す。さらに、これらの改変されたesgRNAコンストラクトを、マーカー遺伝子、例えば実施例に示すような別のEf1a pol IIIプロモーターにより駆動されるmCherryコンストラクトをさらに含むベクター中にクローン化した。これは、esgRNAでトランスフェクトされた細胞についてフローサイトメトリーを使用するソーティング、さらには標的RNA編集による細胞の富化を可能にした。

30

40

【0140】

実施例2 dSpCas9とdSaCas9 CREDITシステムの比較

dSaCas9は、dSpCas9より有意に小さく、ウイルスパッケージングにおいて効率性をもたらす。CREDITシステムを、(1) GSGSリンカーを用いたADAR2 (E488Q) - dSaCas9融合物 (配列番号12)、および(2) EGFPレポーターを標的とする、SaCas9に特異的なスキャフォールド配列を有するesgRNA (配列番号11) を含め、調製した。図13Bに示すように、このシステムによるmRNA編集効率を、ADAR2 (E488Q) - dSpCas9を含むシステムと比較した。ADAR2 - dSpCas9による約20%と比較して、ADAR2 - dSaCas9では、標的細胞の約30%が編集されたEGFP RNAを発現することに成功した。

50

総じて、このデータは、A D A R 2 - d S a C a s 9 および A D A R 2 - d S p C a s 9 の両方において編集が成功したことを示している。

【 0 1 4 1 】

実施例 3 肢帯型筋ジストロフィー 2 B 型の治療

肢帯型筋ジストロフィー 2 B 型は、ジスフェリン遺伝子内の欠陥により引き起こされる。対象内のジスフェリン mRNA を正確に修正する方法を開発することにより、完全に機能的なジスフェリントタンパク質が、この障害を有する患者内で発現され得る。

【 0 1 4 2 】

本開示の組み換え発現系は、変異体ジスフェリン mRNA の簡便な修正を可能にする。開示される A A V 送達システムと組み合わせたとき、これらのシステムは、単回静脈内投与することであらゆる主要な筋肉を効率的に標的とするのに使用可能であり、また筋ジストロフィーを治療するための強力な治療戦略を提供する。A A V は骨格筋を標的とするのに最終的に使用されるので、骨格筋親和性を有する A A V、例えば A A V 1、A A V 6、A A V 7、A A V 8、または A A V 9 等を使用すべきである。

【 0 1 4 3 】

ウイルス粒子は、本明細書に記載されるように調製される。要するに、実施例 1 に記載するように、F l p - I n T - R E X 2 9 3 細胞に、ベクターをトランスフェクトした。e s g R N A は、対象のジスフェリン mRNA 内の変異遺伝子座を標的とするように設計される。e s g R N A は、下記のジスフェリン mRNA のうちの 1 つまたは複数における変異を標的とするように設計可能である：NM__001130455、NM__001130976、NM__001130977、NM__001130978、NM__001130979、NM__001130980、NM__001130981、NM__001130982、NM__001130983、NM__001130984、NM__001130985、NM__001130986、NM__01130987、または NM__003494。いくつかの実施形態では、修正可能な A 点変異の存在を確認するために、e s g R N A の設計前に、対象のジスフェリン mRNA が配列決定される。e s g R N A をコードする核酸が、適するベクターにクローン化される。パッケージング細胞のトランスフェクションの後で、アセンブルされたウイルス粒子が採取され、そして C a s 9 タンパク質の発現、ならびに e s g R N A の発現について試験される。パッケージングされたウイルスは、ウイルス力価についてもアッセイされ、該ウイルス力価は、約 10^8 G C / m L ~ 10^{17} G C / m L の範囲であるべきであり、約 10^{13} G C / m L の力価が最適である。ウイルス力価は、ウェスタンブロットにより、または q P C R によるウイルスゲノムコピー数によりアッセイ可能であり、そして標準サンプルのコピー数と比較可能である。

【 0 1 4 4 】

改変されたウイルス粒子は、肢帯型筋ジストロフィー 2 B 型を有する対象から得られた筋幹細胞または前駆細胞に、e x v i v o または i n v i t r o で投与され得る。ウイルスベクターが組み込まれたら、改変された細胞は、筋肉内注射により対象に再移植される。改変された A A V で処置された細胞を用いた細胞療法の有効性は、筋肉形態の改善、多量体化したジストロフィン - 糖タンパク質複合体およびニューロン酸化窒素シンターゼの筋細胞膜局在化の減少、ならびにジスフェリン発現の検出により測定される。

【 0 1 4 5 】

あるいは、ウイルス粒子は、例えば、筋肉内注射、腹腔内注射、または静脈内注射等の局所送達または全身送達を通じて、筋肉組織に i n v i v o で投与され得る。ウイルス遺伝子療法の有効性は、筋肉形態の改善、ならびにジスフェリン発現の検出により測定される。

【 0 1 4 6 】

C R I S P R 媒介式の R N A 編集の有効性は、修復されたジスフェリン mRNA 断片の逆転写されたコピーを検出する P C R プライマーを設計することによりアッセイされる。修復された遺伝子産物の発現は、治療された筋肉組織の P C R、組織学的染色、またはウェスタンブロットによっても検出可能である。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 7 】

実施例 4 C F T R m R N A の編集

嚢胞性線維症は、肺、膵臓、肝臓、腎臓、および腸に影響を及ぼす遺伝的障害である。長期的な症状として、多発する肺感染症の結果として生ずる呼吸困難および粘液吐出が挙げられる。その他の兆候および症状として、副鼻腔感染症、成長不良、脂肪便、指およびつま先の太鼓撥指形成、および不妊症を挙げることができる。嚢胞性線維症は、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) 遺伝子内の変異により引き起こされる。対象内の C F T R m R N A を正確に修正する方法を開発することにより、十分に機能的な C F T R タンパク質が、これらの患者内で発現され得る。

【 0 1 4 8 】

本開示の組み換え発現系は、 C F T R m R N A の簡便な修正を可能にする。 A A V またはレンチウイルス等のウイルス送達システムと組み合わせた場合、このシステムは、患部組織を有効に標的とし、また嚢胞性線維症を治療するための強力な治療戦略を提供するのに使用可能である。肺親和性を有する A A V として、 A A V 4、 A A V 5、 A A V 6、および A A V 9 が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

【 0 1 4 9 】

e s g R N A は、対象の C F T R m R N A 内の変異遺伝子座を標的とするように設計される。いくつかの実施形態では、修正可能な A 点変異の存在を確認するために、 e s g R N A の設計前に対象の C F T R m R N A が配列決定される。 e s g R N A をコードする核酸が、適するベクターにクローン化される。適する C F T R 標的スパー配列の非限定的な例は、配列番号 4 3 である。適する C F T R 延長配列の非限定的な例は、配列番号 4 4 である。 C F T R を標的とする e s g R N A を含むレンチウイルスのプラスミドの非限定的な例は、 L C V 2 _ _ p u r p o _ _ C F T R _ _ 5 1 _ _ 1 2 1 7 _ _ ギブソン (配列番号 3 5) である。

【 0 1 5 0 】

パッケージング細胞のトランスフェクション後、アSEMBLされたウイルス粒子が採取され、そして C a s 9 タンパク質の発現、ならびに e s g R N A の発現について試験される。パッケージングされたウイルスは、ウイルス力価についてもアッセイされ、該ウイルス力価は、約 10^8 G C / m L ~ 10^{17} G C / m L の範囲にあるべきであり、約 10^{13} G C / m L の力価が最適である。ウイルス力価は、ウェスタンブロットにより、または q P C R によるウイルスゲノムコピー数によりアッセイ可能であり、そして標準的なサンプルのコピー数と比較可能である。

【 0 1 5 1 】

ウイルス粒子は、例えば、腹腔内注射、臓器標的注射、または静脈内注射等の局所送達または全身送達を通じて、 i n v i v o で対象に投与され得る。ウイルス遺伝子療法の有効性は、肺機能の改善、嚢胞性線維症の 1 つもしくは複数の症状の軽減もしくは改善、および/または修正された C F T R タンパク質発現の検出により測定される。

【 0 1 5 2 】

C R I S P R 媒介式の R N A 編集の有効性は、修復された C F T R m R N A 断片の逆転写されたコピーを検出する P C R プライマーを設計することによりアッセイされる。修復された遺伝子産物の発現は、治療された肺組織の P C R、組織学的染色、またはウェスタンブロットによりやはり検出可能である。

【 0 1 5 3 】

実施例 5 I D U A m R N A の編集

ハーラー症候群は、リソゾーム内でのムコ多糖の分解に関与する酵素である - L イズロニダーゼ (I D U A) の欠陥に起因して、グリコサミノグリカンの蓄積を引き起こす遺伝的障害である。この酵素がなければ、デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸の蓄積が体内で生ずる。症状として、肝脾腫、低身長症、特有の顔つき、進行性の精神遅滞、および臓器障害に起因する早期死亡が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

【 0 1 5 4 】

10

20

30

40

50

本開示の組み換え発現系は、IDUA mRNAの簡便な修正を可能にする。AAVまたはレンチウイルス等のウイルス送達システムと組み合わせたとき、このシステムは、ハーラー症候群を治療するための強力な治療戦略を提供するのに使用可能である。

【0155】

esgRNAは、対象のIDUA mRNA内の変異体遺伝子座を標的とするように設計される。いくつかの実施形態では、修正可能なA点変異の存在を確認するために、esgRNAの設計前に対象のIDUA mRNAが配列決定される。esgRNAをコードする核酸が、適するベクターにクローン化される。適するIDUA標的スパー配列の非限定的な例は、配列番号45である。適するIDUA延長配列の非限定的な例は、配列番号46である。IDUAを標的とするesgRNAを含むレンチウイルスプラスミドの非限定的な例は、AXCM_LCV2_puro_IDUA_No-spacer_gibson(配列番号39)である。

10

【0156】

パッケージング細胞のトランスフェクション後、アセンブルされたウイルス粒子が採取され、そしてCas9タンパク質の発現、ならびにesgRNAの発現について試験される。パッケージングされたウイルスは、ウイルス力価についてもアッセイされ、該ウイルス力価は、約 10^8 GC/mL ~ 10^{17} GC/mLの範囲であるべきであり、約 10^{13} GC/mLの力価が最適である。ウイルス力価は、ウェスタンブロットにより、またはqPCRによるウイルスゲノムコピー数によりアッセイ可能であり、そして標準的なサンプルのコピー数と比較され得る。

20

【0157】

ウイルス粒子は、例えば、静脈内注射等の全身送達を通じてin vivoで対象に投与され得る。ウイルス遺伝子療法の有効性は、対象内のヘパリン硫酸の量の減少、ハーラー症候群の1つもしくは複数の症状の軽減もしくは改善、および/または修正されたIDUAタンパク質の発現の検出により測定される。

【0158】

CRISPR媒介式のRNA編集の有効性は、修復されたIDUA mRNA断片の逆転写されたコピーを検出するPCRプライマーを設計することによりアッセイされる。修復された遺伝子産物の発現は、治療された組織のPCR、組織学的染色、またはウェスタンブロットにより、やはり検出可能である。

30

【0159】

等価物

本発明は好ましい実施形態および任意選択的な特性によって特別に開示されてきたが、本明細書において開示されるような、そこで具体化される本発明の改変、改善、および変更は、当業者によってなし得ること、およびそのような改変、改善、および変更は本発明の範囲内にあるとみなされるものと理解すべきである。ここで提示される物質、方法、および実施例は、好ましい実施形態の代表であり、例示的であり、および本発明の範囲に対する制限とは意図されない。

【0160】

本発明は、本明細書において、広範囲にわたり、一般的に記載されている。一般的な開示の範囲内に含まれるより狭い種および亜属のグルーピングのそれぞれもまた本発明の一部をなす。これには、切り取られた物質が本明細書において特別に列挙されているまたはいないに関わらず、属から任意の主題を除去するただし書きまたは否定的限定を伴う本発明の一般的な説明が含まれる。

40

【0161】

さらに、本発明の特徴または側面が、マーカッシュ群において記載されている場合、当業者は、本発明は、マーカッシュ群のメンバーを構成する任意の個々のメンバーまたはサブグループにおいても記載されているものと認識する。

【0162】

本明細書に記載されるすべての公開資料、特許出願、特許、およびその他の参考資料は

50

、あたかもそのそれぞれが参考として個別に組み込まれているかのように、それと同じ程度で参考としてそのまま明示的に組み込まれている。矛盾する場合、本明細書が、定義を含め、コントロールする。

【 0 1 6 3 】

【表 6】

参考文献

1. Fukuda, M., et al., Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 41478. 10
2. Halo et al "NanoFlares for the detection, isolation, and culture of live tumor cells from human blood" *PNAS* doi: 10.1073/pnas.1418637111.
3. Hanswillemenke et al., Site-Directed RNA Editing in Vivo Can Be Triggered by the Light-Driven Assembly of an Artificial Riboprotein. *J Am Chem Soc*, 2015. 137(50): p. 15875-81.
4. Hua et al "Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model." *Nature*. 2011 Oct 5;478(7367):123-6. doi: 10.1038/nature10485. 20
5. McMahon et al., TRIBE: Hijacking an RNA-Editing Enzyme to Identify Cell-Specific Targets of RNA-Binding Proteins. *Cell*, 2016. 165(3): p. 742-53.
6. Montiel-Gonzalez et al "An efficient system for selectively altering genetic information within mRNAs." *Nucleic Acids Res*. 2016 44: e157. doi: 10.1093/nar/gkw738. 30
7. Montiel-Gonzalez et al "Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing." *PNAS*. 2013 110: 18285-90.
8. Schneider et al "Optimal guideRNAs for re-directing deaminase activity of hADAR1 and hADAR2 in *trans*." *Nucleic Acids Res*. 2014 42: e87. doi: 10.1093/nar/gku272.
9. Wang et al "Engineering splicing factors with designed specificities" *Nat Methods*. 2009 Nov; 6(11): 825–830. 10.1038/nmeth.1379 40
10. WO 2015089277
11. WO 2016183402

【 0 1 6 4 】

配列

本明細書に記載される構築物の例示的配列を以下に提供する。

【 0 1 6 5 】

【表 7】

pcDNA3.1(1) ADAR2 XTEN dCas9 (配列番号 27)

LOCUS	Exported	10826 bp ds-DNA	circular	
DEFINITION	synthetic circular DNA			
SOURCE	synthetic DNA construct			
ORGANISM	recombinant plasmid			
REFERENCE	1 (bases 1 to 10826)			
FEATURES	Location/Qualifiers			10
source	1..10826	/organism="recombinant plasmid"		
		/mol_type="other DNA"		
enhancer	235..614	/label=CMV enhancer		
		/note="human cytomegalovirus immediate early enhancer"		
promoter	615..818	/label=CMV promoter		
		/note="human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter"		20
promoter	863..881	/label=T7 promoter		
		/note="promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase"		
misc_feature	927..954	/label=Homology 1_pCDNA3.1		
primer_bind	955..976	/label=ADAR2CD-Cas9_HindIII_F		
misc_feature	955..960	/label=Kozak		
primer_bind	960..983	/label=Adar_out_forward_iv2		30
CDS	961..2100	/codon_start=1		
		/label=ADARB1_Catalytic Domain		
/translation="MLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLGVVMTTGTQDVKDA KVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRSLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSI FQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILPEPADRHPNRKARGQLRTKI ESGEGTIPVRSNASIQTWGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFS				40

SIILGSLYHGDHL SRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNW
TVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVP SHLLRSKITKPNVYHES
KLA AKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPT EQDQFSLTP"

primer_bind 1324..1346
/label=E488Q_ADAR2_Mut_seq

primer_bind complement(1426..1447)
/label=E488Q_Mut_Classic_R

primer_bind 1448..1472
/label=E488Q_Mut_Classic_F

CDS 2101..2148
/codon_start=1
/label=XTEN
/translation="SGSETPGTSESATPES"

10

primer_bind complement(2129..2148)
/label=ADAR2_CD_Inverse_R

CDS 2149..6252
/codon_start=1
/product="catalytically dead mutant of the Cas9
endonuclease from the Streptococcus pyogenes Type II
CRISPR/Cas system"
/label=dCas9
/note="RNA-guided DNA-binding protein that lacks
endonuclease activity due to the D10A mutation in the RuvC
catalytic domain and the H840A mutation in the HNH
catalytic domain"

20

/translation="MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKK
NLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFHRL EES
FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK
FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRLL
ENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQ
IGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR
QQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLV KLNREDLL
RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRI PYYVGPLARG
NSRFAMTRKSEETITPWNFEEVVDK GASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVL PKHSLLEYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD
SVEISGVEDRFNASLGT YHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EER
LKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKS DGFANRNFM
QLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA I KKGILQTVKVVDELVKVMGR
HKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY
LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVP

30

40

SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGELSELDKAGFIKRQLVETRQITKH
 VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL
 NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKT
 EITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVKKTVEVQTGGFSK
 ESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKSKKLLKSVKELLGI
 TIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE
 LALPSKYVNFYLYLASHYEKLGSPEDNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVI LAD
 ANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL
 DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD"

10

primer_bind complement(6233..6252)
 /label=Cas9_out_rev_lv2

primer_bind 6253..6274
 /label=ADAR2_CD_Inverse_F

CDS 6256..6282
 /codon_start=1
 /product="HA (human influenza hemagglutinin) epitope tag"
 /label=HA
 /translation="YPYDVPDYA"

CDS 6301..6321
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"

20

CDS 6328..6348
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"

30

primer_bind complement(6332..6357)
 /label=ADAR2CD-Cas9_NotI_R

misc_feature 6358..6392
 /label=Homology 2_pCDNA3.1

polyA_signal 6426..6650
 /label=bGH poly(A) signal
 /note="bovine growth hormone polyadenylation signal"

rep_origin 6696..7124
 /direction=RIGHT
 /label=f1 ori
 /note="f1 bacteriophage origin of replication; arrow"

40

indicates direction of (+) strand synthesis"

promoter 7138..7467
 /label=SV40 promoter
 /note="SV40 enhancer and early promoter"

rep_origin 7318..7453
 /label=SV40 ori
 /note="SV40 origin of replication"

CDS 7534..8328
 /codon_start=1
 /gene="aph(3')-II (or nptII)"
 /product="aminoglycoside phosphotransferase from Tn5"
 /label=NeoR/KanR
 /note="confers resistance to neomycin, kanamycin, and G418 (Geneticin(R))" 10

/translation="MIEQDGLHAGSPAAWVERLFGYDWAQQTIGCSDAAVFRLSAQGRP
 VLFVKTDLSGALNELQDEAARLSWLATTGVPCA AVL DVVTEAGRDWLLLGEVPGD LLS
 SHLAPAEKVSIMADAMRRLHTLDPATCFPDHQAKHRIERARTRMEAGLVDQDDLDEEHQ
 GLAPAEELFARLKARMPDGEDLVVTHGDACLPNIMVENGRFSGFIDCGRLGVADRYQDIA
 LATRDIAEELGGEWADRFLVLYGIAAPDSQRIAFYRLLDEFF" 20

polyA_signal 8502..8623
 /label=SV40 poly(A) signal
 /note="SV40 polyadenylation signal"

primer_bind complement(8672..8688)
 /label=M13 rev
 /note="common sequencing primer, one of multiple similar variants"

protein_bind 8696..8712
 /label=lac operator
 /bound_moiety="lac repressor encoded by lacI" 30
 /note="The lac repressor binds to the lac operator to inhibit transcription in E. coli. This inhibition can be relieved by adding lactose or isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)."

promoter complement(8720..8750)
 /label=lac promoter
 /note="promoter for the E. coli lac operon"

protein_bind 8765..8786
 /label=CAP binding site
 /bound_moiety="E. coli catabolite activator protein" 40
 /note="CAP binding activates transcription in the presence

```

of cAMP."
rep_origin complement(9074..9659)
  /direction=LEFT
  /label=ori
  /note="high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of
  replication"
CDS complement(9830..10690)
  /codon_start=1
  /gene="bla"
  /product="beta-lactamase"
  /label=AmpR
  /note="confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and
  related antibiotics"

```

10

```

/translation="MSIQHFRVALI PFFAAFC L P VFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYI
ELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYS
PVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLLTITGGPKELTAF LHNMGDHSVRLDRW
EPELNEAIPNDERDITMPVAMATTLRKLITGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSA
LPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGAS
LIKHW"

```

20

```

promoter complement(10691..10795)
  /gene="bla"
  /label=AmpR promoter

```

ORIGIN

```

1 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg
61 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg
121 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc
181 itagggttag gcgtttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt
241 gattattgac tagtattaa tagtaataca ttacggggtc attagttcat agcccatata
301 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc
361 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc
421 attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt
481 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt
541 atgccagta catgacctta tgggacttct ctacttgcca gtacatctac gtattagtca
601 tcgctattac catggtgatg cggtttggc agtacctcaa tgggcgtgga tagcggtttg
661 actcagggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagttg ttttggcacc
721 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggggc
781 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca
841 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctagc
901 gtttaaaccg gccctctaga ctcgagcggc cgccactgtg ctggatatct gcagagaacc
961 atgtagctg acgctgtctc acgctggc ctgggtaagt ttggtgacct gaccgacaac

```

30

40

1021 ttctctccc ctacgctcg cagaaaagtg ctggctggag tegtcatgac aacaggcaca
 1081 gatgttaag atgccaaggt gataagtgt tctacaggaa caaatgtat faatgggtgaa
 1141 tacatgagt atcgtggcct tgcattaat gactgccatg cagaataat atctcggaga
 1201 tcttctca gatttctta tacacaact gagctttact taataacaa agatgatcaa
 1261 aaaagatcca tcttcagaa atcagagcga ggggggtta ggctgaagga gaatgtccag
 1321 tttcatctgt acatcagcac ctctccctgt ggagatgcca gaattctc accacatgag
 1381 ccaatcctgg aagaaccagc agatagacac ccaatcgtg aagcaagagg acagctacgg
 1441 accaaaatag agtctgggta ggggacgatt ccagtgcgt ccaatgcgag catccaaacg
 1501 tgggacggg tgctgcaagg ggagcggctg ctaccatgt cctgcagtga caagattgca 10
 1561 cgctggaac tgggggat ccaggatcc ctgctcagca tttctgga gccattfac
 1621 ttctcagca tcatctggg cagccttac cacggggacc accttccag ggccatgtac
 1681 cagcggatc ccaacataga ggacctgcca cctcttaca cctcaacaa gccttggct
 1741 agtggcatca gcaatcaga agcacggcag ccagggaagg ccccaactt cagtgtcaac
 1801 tggacgtag gcgactccg tattgaggtc atcaaccca cgactgggaa ggatgagctg
 1861 ggccgcgct cccgctgtg taagcacgc ttgtactgt gctggatcg tgtcacggc
 1921 aaggttccct cccacttact acgtccaag attaccaag ccaactgtg ccatgagtc
 1981 aagctggcgg caaaggagta ccaggccgc aaggcgcgtc tttcacagc tttcatcaag
 2041 gcgggctgg gggcctgggt ggagaagccc accgagcagg accagtctc actcacgcc
 2101 agtggaaagt agacaccggg aacctcagag agcggcacgc cagaagcat ggacaagaag
 2161 tacagcatc gctggccat cggcaccaac tctgtggct gggccgtgat caccgacgag 20
 2221 tacaaggtgc ccagcaagaa attcaaggtg ctgggcaaca ccgaccgca cagcatcaag
 2281 aagaactga tggcgccct gctgtcagc agcggagaaa cagccgaggc caccggctg
 2341 aagagaaccg ccagaagaag atacaccaga cggagaacc ggatctgcta tctcaagag
 2401 atctcagca acgagatgg caaggtggac gacagcttct tccacagact ggaagagtcc
 2461 ttctggtgg aagaggataa gaagcagcag cggcaccca tctcggca catcgtggac
 2521 gagtggcct acccagaaa gtacccacc atctaccacc tgagaaagaa actggtggac
 2581 agcaccgaca aggccgacct cggcgtgat tcttggccc tggccacat gatcaagtc
 2641 cggggccact tctgatcga gggcgacctg aacccgaca acagcgact ggacaagctg
 2701 tttaccagc tggtcagac ctacaaccag ctgttcgagg aaaacccat caacgccagc
 2761 ggcgtggac ccaagccat cctgtctgcc agactgagca agagcagacg gctggaaaat 30
 2821 ctgatcgccc agctgcccgg cgagaagaag aatggcctgt tggcaacct gattgccctg
 2881 agcctggccc tgaccccaa ctcaagagc aactcagacc tggccgagga tgccaaactg
 2941 cagctgagca aggacaceta cgacgacgac ctggacaacc tggggccca gatcggcgac
 3001 cagtacgcc acctgttct gggcccaag aacctgtccg acgcatcct gctgagcgac
 3061 atcctgagag tgaacaccga gatcacaag gcccccctga gcgctctat gatcaagaga
 3121 tacgacgagc accaccagga cctgacctg ctgaaagctc tctgctggca gcagctgct
 3181 gagaagtaca aagagatttt ctctgaccag agcaagaacg gctacgccgg ctacatgat
 3241 ggcggagcca gccaggaaga gttctacaag tttatcaagc ccatctgga aaagatggac
 3301 ggcaccgagg aactgctctg gaagctaac agagaggacc tctgctggaa gcagcggacc
 3361 ttcgacaacg gcagcatccc ccaccagatc cacctgggag agctgcacgc cattctcgg
 3421 cggcaggaag attttacc atctctgaag gacaaccggg aaaagatcga gaagatcctg 40

3481 accttccgca tcccacta cgtgggccct ctggccagg gaaacagcag atfcgctg
 3541 atgaccagaa agagcgagga aaccatcacc ccctggaact tcgaggaagt ggtggacaag
 3601 ggcgccagcg cccagagctt catcgagcgg atgaccaact tcgataagaa cctgccaac
 3661 gagaaggctg tcccaagca cagcctgctg tacgagtact tcaccgtgta caacgagctg
 3721 accaaagtga aatacgtgac cgagggaatg agaaagccc ccttctgag cggcgagcag
 3781 aaaaaagcca tcgtggacct gctgttcaag accaaccgga aagtgacct gaagcagctg
 3841 aaagaggact actcaagaa aatcgagtgc ttcgactccg tggaaatctc cggcgtggaa
 3901 gatcggttca acgctcctt gggcacatac cagatctgc tgaataatt caaggacaag
 3961 gacttctgga acaatagga aaacgaggac attctggaag atactgtgct gaccctgaca 10
 4021 ctgtttgagg acagagagat gatcgaggaa cggctgaaaa cctatgcca cctgttcgac
 4081 gacaaagtga tgaagcagct gaagcggcgg agatacaccg gctggggcag gctgagccgg
 4141 aagctgatca acggcatccg ggacaagcag tccggcaaga caatcctgga tttctgaag
 4201 tccgacggct tcgcaacag aaacttcatg cagctgatcc acgacgacag cctgacctt
 4261 aaagaggaca tcagaaagc ccaggtgtcc ggccaggcgg atagcctgca cgagcacatt
 4321 gccaatctgg ccggcagccc cgccattaag aaggcctcc tgcagacagt gaaggtggtg
 4381 gacgagctcg taaaagtgt gggccggcac aagcccgaga acatcgtgat cgaatggcc
 4441 agagagaacc agaccacca gaaggacag aagaacagcc gcgagagaat gaagcggatc
 4501 gaagagggca taaagagct gggcagccag atcctgaaag aacaccccgt ggaaaacacc
 4561 cagctgcaga acgagaagct gtacctgtac tacctgcaga atggcgggga tatgtactg 20
 4621 gaccaggaac tggacatcaa ccggctgtcc gactacgatg tggacgctat cgtgcctcag
 4681 agctttctga aggacgactc catcgataac aaagtgtgta ctcggagcga caagaaccgg
 4741 ggcaagagcg acaactgtcc ctccgaagag gtcgtgaaga agatgaagaa ctactggcgc
 4801 cagctgctga atgcaagct gattaccag aggaagtgc acaatctgac caaggccgag
 4861 agaggcgccc tgagcgaact ggataagcc ggcttcatca agagacagct ggtggaaacc
 4921 cggcagatca caaagcagct ggcacagatc ctggactccc ggatgaacac taagtacgac
 4981 gagaacgaca aactgatccg ggaagtgaat gtgatcacc tgaagtcaa gctgggttcc
 5041 gattccgga aggatttcca gtttataaa gtgcgagaga tcaacaacta ccaccagcc
 5101 cagcagcct acctgaacgc cgtcgtggga accgccctga tcaaaaagta cctaagctg
 5161 gaaagcagct tcgtgtacgg cgactacaag gtgtacgacg tgcggaagat gatcgccaag
 5221 agcagcagc aaatcggcaa ggctaccgc aagtactct tctacagcaa catcatgac 30
 5281 ttttcaaga ccgagattac cctggccaac ggcgagatcc ggaagcggcc tctgatcgag
 5341 acaaacggcg aaacagcga gatcgtgtgg gataagggcc gggactttgc caccgtcgg
 5401 aaagtgtgt ctatgcccc agtgaatct gtgaaaaa cagaggtgca gacagcggc
 5461 ttcagcaag agtctatct gcccaagagg aacagcgaca agctgatcgc cagaagaag
 5521 gactgggacc ctaagaagta cggcggcttc gacagcccc cgtggccta tctgtgctg
 5581 gtggtggcca aagtggaaaa gggcaagtcc aagaactga agagtgtgaa agagctgctg
 5641 gggatacca tcatggaaag aagcagcttc gagaagaatc ccatcgactt tctggaagc
 5701 aagggttaca aagaagtga aaaggacctg atcatcaagc tgcctaagta ctccctgtc
 5761 gagctggaaa acggccggaa gagaatgctg gcctctgccg gcgaactgca gaagggaaac
 5821 gaactggccc tgcctccaa atatgtgaac tctctgtacc tggccagcca ctatgagaag
 5881 ctgaagggct cccccagga taatgagcag aaacagctgt ttgtggaaca gcacaaacac 40

5941 tacctggacg agatcatcga gcagatcagc gagttctcca agagagtgat cctggccgac
6001 gctaactctgg acaaggtgct gagcgcctac aacaagcaca gagacaagcc tatcagagag
6061 caggcccgaga atatcatcca cctgtttacc ctgaccaatc tgggagcccc tgcgccttc
6121 aagtactttg acaccacat cgaccggaag aggtacacca gcaccaaaaga ggtgctggac
6181 gccaccctga tccaccagag catcaccggc ctgtacgaga cacggatcga cctgtctcag
6241 ctgggaggcg acgcctatcc ctatgacgtg cccgattatg ccagcctggg cagcggctcc
6301 cccaagaaaa aacgcaaggt ggaagatcct aagaaaaagc ggaaagtgga cgtgtaacca
6361 ccacactgga ctagtggatc cgagctcggc accaagctta agttfaaac gctgatcagc
6421 ctgactgtg ccttctagt gccagccatc tgttgttgc ccctccccg tgccttctt 10
6481 gaccctggaa ggtgccactc cactgtctct ttctaataa aatgaggaaa ttgatcgcga
6541 ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga
6601 ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg ggatgctggg ggctctatgg cttctgaggc
6661 ggaagaacc agctggggct ctagggggta tccccgcgc cctgtagcg gcgcattaag
6721 cgcggcgggt gtgtgggta cgcgcagcgt gaccgctaca ctggccagcg cctagcggc
6781 cgtctcttc gtttcttc ctctcttc cgccacgttc gccggcttc cccgtcaagc
6841 tctaatcgg gggctccct tagggttccg attagtgtc ttacggcacc tgcacccaa
6901 aaaactgat tagggtagt gttcacgtag tggccatcg cctgataga cggttttcg
6961 cctttgacg ttggagtcca cgtctttaa tagtggactc ttgtccaaa ctggaacaac
7021 actcaacct atctcgtct attctttga ttataaggg atttgcccga ttctggccta 20
7081 ttggtaaaa aatgagctga ttaacaaaa attaacgcg aattaattct gtggaatgtg
7141 tctcagttag ggtgtgaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagat gcaaagcatg
7201 catccaatt agtcagcaac cagggtgga aagccccag gctccccagc aggcagaagt
7261 atgcaagca tgcactcaa ttagtacga accatagtcc cgcccctaac tcccccac
7321 ccgcccctaa ctccgcccag ttcccccct tctccgccc atggctgact aattttttt
7381 attatgacg agggcaggc cgctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc
7441 tttttggag gcttaggct ttgcaaaaag clccgggag ctgtatate cattttcga
7501 tctgatcaag agacaggatg aggatcgtt cgcagtattg aacaagatgg attgcacgca
7561 ggttccggg ccgctgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc
7621 ggctgctcg atccgcccgt gtlccggctg tcagcgcagg ggcgcccgt tcttttgc
7681 aagaccgacc tctccgtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtg 30
7741 ctggccacga cgggcgttc ttgcgcagct gtgctcagc ttgtactga agcgggaagg
7801 gactggctgc tttgggca agtgccggg caggatctc tctatctca cttgtctct
7861 gccgagaaag tatcatcat ggctgatgca atgcggcgc tgcatacgt tgatccggct
7921 acctgcccct tgcaccaca agcgaacat cgcacgagc gagcacgtac tggatggaa
7981 gccggtctg tcatcagga tcatctggac gaagagcctc aggggctcgc gccagccgaa
8041 ctgttcgcca ggtcaaggc gcgatgccc gacggcgagg atctcgtct gacctatggc
8101 gatgcctgct tgcgaatat catggtgga aatggccgct ttctggatt catcactgt
8161 ggccgctgg gttggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccg tgatattgt
8221 gaagagcttg gcggcaatg ggtgaccgc ttctcgtgc ttacggtat cgcgctccc
8281 gattcgcagc gcatgcctt ctatgcctt cttgacgagt tctctgagc gggactctgg
8341 ggttcgaat gaccgacaa gcgacgcca acctgcccac acgagattc gattccaccg 40

8401 ccgccttcta tgaagggtg ggcttcggaa tcgtttccg ggacgccggc tggatgatcc
8461 tccagcgcgg ggcattcatg ctggagttct tcgcccaccc caacttgttt attgcagctt
8521 ataatggfta caataaagc aatagcatca caaattcac aaataaagca ttttttcac
8581 tgcattctag ttgtggttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt
8641 cgacctctag ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctgtg tgaattgtt
8701 atccgctcac aatccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg
8761 cctaattgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct tccagtcgg
8821 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc
8881 gtattggcgc ctcttccgct tcctcgtca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc 10
8941 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata
9001 acgcaggaaa gaacatgta gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggcgg
9061 cgttgctggc gttttccat aggctccgcc ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct
9121 caagtcagag gtggcgaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa
9181 gctccctcgt gcgctctct gttccgacct tgcgcttac cggatacctg tccgcttfc
9241 tcccttggg aagcgtggcg ctctctata gtcacgctg taggtatctc agttcgggtg
9301 aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg
9361 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaa acacgactta tcgccactgg
9421 cagcagccac tgtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagtct
9481 tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttgtatc tgcgctctc
9541 tgaagccagt tacctcggg aaaagagttg gtactcttg atccggcaaa caaacaccg 20
9601 ctggtagcgg ttttttgtg tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaa ggcattcaag
9661 aagatccttt gatctttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag
9721 ggattttgt catgagatta tcaaaaagga tctcaccta gatctttta aattaaat
9781 gaagtttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gctcagact taccaatgct
9841 taatcagtg ggcacctate tcagcagatc gtctatttgc tcatccata gttcctgac
9901 tccccgctg gtatataact acgalacggg agggcttacc atctggcccc agtgcgcaa
9961 tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttate agcaataaac cagccagccg
10021 gaaggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctctatccgc ctccatccag tctattaat
10081 gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagftaatag ttgcgcaac gttgttcca
10141 ttgctacagg catcgtggg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcatc agctccgggt 30
10201 cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgtgtg caaaaagcg gttagctcct
10261 tcggtctcc gatcgttgc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg
10321 cagcactgca taattctct actgtcatgc catccgtaag atgctttct gtactggg
10381 agtactcaac caagtcatc tgagaatagt gtatcggcg accgagttgc tctgccccg
10441 cgtcaatagc ggataatacc gcgccacata gcagaactt aaaaagtctc atcattggaa
10501 aacgttttc ggggcgaaaa ctctcaagga tctaccgct gttgagatcc agttcgatg
10561 aaccactcg tgcaccaac tgatctcag catctttac ttcaccagc gtttctgggt
10621 gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgt
10681 gaatactcat actctctt ttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca
10741 tgagcggata catattttaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggt cgcgcacat
10801 tccccgaaa agtgcacct gacgct 40

【 0 1 6 6 】

【表 8】

pcDNA3.1(1) ADAR2 XTEN コントロール (配列番号 28).

LOCUS Exported 6722 bp ds-DNA circular

DEFINITION synthetic circular DNA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..6722
 /organism="synthetic DNA construct"
 /mol_type="other DNA" 10

enhancer 235..614
 /label=CMV enhancer
 /note="human cytomegalovirus immediate early enhancer"

promoter 615..818
 /label=CMV promoter
 /note="human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter"

promoter 863..881
 /label=T7 promoter
 /note="promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase"

misc_feature 927..954 20
 /label=Homology 1_pCDNA3.1

primer_bind 955..976
 /label=ADAR2CD-Cas9_HindIII_F

primer_bind 960..983
 /label=Adar_out_forward_iv2

CDS 961..2100
 /codon_start=1
 /label=ADARB1(E488Q)_Catalytic Domain

/translation="MLADAVSRLVVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMTTGT'DVKDA
 KVISVSTG'TKCI'NGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSI
 FQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPIL'EEPADRHPN'RKARGQLRTKI
 ESGEGTIPVRSNASIQ'TWDGVLQGERLL'FMSCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFS
 SII'LGSLYHGDHLSR'AMYQRISNI'EDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNW
 TVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVP'SHLLRSKITKPNVYHES
 KLA'AEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPT'EQDQFSLTP"

primer_bind 1324..1346
 /label=E488Q_ADAR2_Mut

primer_bind complement(1426..1447)
 /label=E488Q_Mut_Classic_R

primer_bind 1448..1472 40
 /label=E488Q_Mut_Classic_F

CDS 2101..2148
 /codon_start=1
 /label=XTEN
 /translation="SGSETPGTSESATPES"
 primer_bind complement(2129..2148)
 /label=ADAR2_CD_Inverse_R
 primer_bind 2149..2170
 /label=ADAR2_CD_Inverse_F
 CDS 2152..2178 10
 /codon_start=1
 /product="HA (human influenza hemagglutinin) epitope tag"
 /label=HA
 /translation="YPYDVPDYA"
 CDS 2197..2217
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"
 CDS 2224..2244 20
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"
 primer_bind complement(2228..2253)
 /label=ADAR2CD-Cas9_NotI_R
 misc_feature 2254..2288
 /label=Homology 2_pCDNA3.1
 polyA_signal 2322..2546 30
 /label=bGH poly(A) signal
 /note="bovine growth hormone polyadenylation signal"
 rep_origin 2592..3020
 /direction=RIGHT
 /label=f1 ori
 /note="f1 bacteriophage origin of replication; arrow indicates direction of (+) strand synthesis"
 promoter 3034..3363
 /label=SV40 promoter
 /note="SV40 enhancer and early promoter"
 rep_origin 3214..3349 40

/label=SV40 ori
 /note="SV40 origin of replication"
 CDS 3430..4224
 /codon_start=1
 /gene="aph(3')-II (or nptII)"
 /product="aminoglycoside phosphotransferase from Tn5"
 /label=NeoR/KanR
 /note="confers resistance to neomycin, kanamycin, and G418
 (Geneticin(R))" 10

/translation="MIEQDGLHAGSPAAWVERLFGYDWAQQQTIGCSDAAVFRLSAQGRP
 VLFVKTDLSGALNELQDEAARLSWLATTGVPCAAVLDVVTEAGRDWLLLGEVPGDLLS
 SHLAPAEKVSIMADAMRRLHTLDPATCFPDHQAKHRIERARTRMEAGLVDQDDLDEEHQ
 GLAPAELEFARLKARMPDGEDLVVTHGDACLPNIMVENGRFSGFIDCGRLGVADRYQDIA
 LATRDIAEELGGEWADRFLVLYGIAAPDSQRIAFYRLLDEFF"
 polyA_signal 4398..4519
 /label=SV40 poly(A) signal
 /note="SV40 polyadenylation signal"
 primer_bind complement(4568..4584) 20
 /label=M13 rev
 /note="common sequencing primer, one of multiple similar
 variants"
 protein_bind 4592..4608
 /label=lac operator
 /bound_moiety="lac repressor encoded by lacI"
 /note="The lac repressor binds to the lac operator to
 inhibit transcription in E. coli. This inhibition can be
 relieved by adding lactose or
 isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)."
 promoter complement(4616..4646) 30
 /label=lac promoter
 /note="promoter for the E. coli lac operon"
 protein_bind 4661..4682
 /label=CAP binding site
 /bound_moiety="E. coli catabolite activator protein"
 /note="CAP binding activates transcription in the presence
 of cAMP."
 rep_origin complement(4970..5555)
 /direction=LEFT
 /label=ori
 /note="high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of 40

```

replication"
CDS      complement(5726..6586)
        /codon_start=1
        /gene="bla"
        /product="beta-lactamase"
        /label=AmpR
        /note="confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and
        related antibiotics"

/translation="MSIQHFRVALIIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYI
ELDLSNGKILESFRPEERFPMMS'FKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYS
PVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTITGGPKELTAF'LNMGDHSVTRLDRW
EPELNEAIPNDERDTTMPVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSR
LPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGAS
LIKHW"  promoter  complement(6587..6691)
        /gene="bla"
        /label=AmpR promoter

ORIGIN
  1 gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtgcactct cagtacaate tgctctgatg
 61 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgcg gagtagtgcg
121 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc
181 ttagggtagt gcgttttcgc ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt
241 gattattgac tagtattaa tagtaataca ttacggggtc attagtcat agcccatata
301 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc
361 cccgccatt gagctcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc
421 attgacgca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt
481 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt
541 atgccagta catgacctta tgggacttcc ctactggca gtacatctac gtattagtca
601 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaata tgggcgtgga tagcggtttg
661 actcagggg attccaagt ctcacccca ttgacgcaa tgggagttag tttggcacc
721 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg
781 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca
841 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc
901 gtttaaaccg gccctctaga ctgagcggc cgccactgtg ctggatatct gcagagaacc
961 atgtagctg acgctgtctc acgcctggc ctgggtaagt ttggtgacct gaccgacaac
1021 ttctctccc ctcacgctcg cagaaaagtg ctggctggag tcgtcatgac aacaggcaca
1081 gatgttaaag atgccaaggt gataagtgtt tctacaggaa caaaatgtat taatggtgaa
1141 tacatgagt atcgtggcct tgcattaaat gactgccatg cagaaataat atctcggaga
1201 tccttctca gatttctta tacacaactt gagcttact taataacaa agatgatcaa
1261 aaaagatcca tctttcagaa atcagagcga ggggggttta ggctgaagga gaatgtccag
1321 ttcatctgt acatcagcac ctctccctgt ggagatgcca gaatctctc accacatgag

```

10

20

30

40

50

1381 ccaatcctgg aagaaccagc agatagacac ccaaatcgta aagcaagagg acagctacgg
1441 accaaaatag agtctgggga ggggacgatt ccagtgcgct ccaatgogag catccaaacg
1501 tgggacgggg tgctgcaagg ggagcggctg ctcacatgt cctgcagtga caagattgca
1561 cgctggaacg tgggtgggcat ccagggatcc ctgctcagca tttctgtgga gccatttac
1621 ttctcgagca tcactctggg cagcctttac cacggggacc accttccag ggccatgtac
1681 cagcggatct ccaacataga ggacctgcca cctctctaca cctcaaca gcccttgctc
1741 agtggcatca gcaatgcaga agcacggcag ccagggaagg cccccaactt cagtgtcaac
1801 tggacggtag gcgactccgc tattgaggtc atcaacgcca cgaactgggaa ggatgagctg
1861 ggccgcgcgt cccgcctgtg taagcacgcg ttgtactgtc gctggatgog tgtgcacggc 10
1921 aaggttccct cccacttact acgtccaag attaccaagc ccaactgtga ccatgagtc
1981 aagctggcgg caaaggagta ccaggccgcc aaggcgcgtc tgttcacagc cttcatcaag
2041 gcggggctgg gggcctgggt ggagaagccc accgagcagg accagtctc actcacgccc
2101 agtggaaagt agacaccggg aacctcagag agcggccagc cagaaagcgc ctatccctat
2161 gacgtgcccg attatgccag cctgggcagc ggctcccca agaaaaacg caaggtggaa
2221 gatcctaaga aaaagcggaa agtggacgtg taaccaccac actggactag tggatccgag
2281 ctcggtacca agcttaagt taaaccgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagtgtcca
2341 gccatctgtt gtttgcctc ccccgctg cccttgacc ctggaagggt ccaactccac
2401 tgtctttcc taataaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtgggt gtcattctat
2461 tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca 20
2521 tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct ggggctctag
2581 ggggtatccc cagcgcctc gtacggcgcg ataaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg
2641 cagcgtgacc gctacactg ccagcgcct agcggcgcct ctttgcctt tcttcctc
2701 ctttctgccc acgttcgccc gcttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg
2761 gttccgattt agtctttac ggcacctga ccccaaaaaa ctgattagg gtgatggtc
2821 acgtagtggg ccacgcctc gatagacggt tttcgcctt ttgacgttg agtccacgtt
2881 ctttaaatg ggactctgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct cggctctatt
2941 tttgattta taagggatt tgcgatitc ggcctattg taaaaaatg agctgattta
3001 acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtg aatgtgtgc agttagggtg tggaaagtc
3061 ccagctccc cagcaggcag aagtatgca agcatgcat tcaattagc agcaaccagg
3121 tgtggaaagt cccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag 30
3181 tcagcaacca tagtcccgc ctaactccg ccatcccgc cctaactcc gccagttcc
3241 gccattctc cgccccatgg ctgactaatt tttttatt atgcagaggc cgaggccgc
3301 tctgctctg agctattcca gaagtatga ggaggcttt ttggaggcct aggttttgc
3361 aaaaagctcc cgggagcttg tataccatt ttcggatctg atcaagagac aggatgagga
3421 tctttcga tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccc tgggtggag
3481 aggtattctg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cgccgtgtc
3541 cggctgtcag cgcagggggc cccggttct tttgtaaga ccgacctgtc cgtgcccctg
3601 aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tctggctgg ccacgacggg cgttccctgc
3661 gcagctgtc tgcagttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagt
3721 cggggcagg atctctgtc atctacctt gctctgccc agaaagtatc catcatggct
3781 gatgcaatgc ggcggctgca tacgctgat ccggctacct gccattcga ccaccaagc 40

384| aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcctgtcga tcaggatgat
 390| ctggcagaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc
 396| atgcccagac gcgaggact cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgc gaalatcatg
 402| gfggaaaat gccgctttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc
 408| tatcaggaca tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct
 414| gaccgcttcc tcgtcttta cggtatcgcc gctcccalt cgcagcgcac cgccttctat
 420| cgcttcttg acgagttct ctgagcggga ctctgggggt cgaatgacc gaccaagcga
 426| cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc ctctatgaa aggttgggct
 432| tcggaatcgt ttccgggac gccggctgga tgatcctca gcgcggggat ctcatgctgg 10
 438| agttcttcgc ccacccaac ttgttattg cagctataa tggttacaa taaagcaata
 444| gcatcacaaa ttcacaaat aaagcattt ttactgca ttctagtgt ggttgtcca
 450| aactcatcaa tctatctat catgtctgta tacctcgac ctctagctag agcttggcgt
 456| aatcatggc atagctgtt cctgtgtgaa attgtatcc gctcacaatt ccacacaaca
 462| tacgagccgg aagcataaag tgtaaacct ggggtgccta atgagtgagc taactacat
 468| taattgcgtt gcgctcact cccgcttcc agtcgggaaa cctgtcgtc cagctgcatt
 474| aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tggcgctct tccgcttct
 480| cgctcactga ctgcctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatca gctcactcaa
 486| aggcggtaat acggtatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa
 492| aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa agcccgctt gctggcgtt ttccataggc
 498| tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga 20
 504| caggactata aagataccag gcgttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgtt
 510| cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg ccttctccc ttccgggaagc gtggcgctt
 516| ctcatagctc acgctgtagg tatctcagt cgggttaggt cgttcgctcc aagctgggct
 522| gtgtgcacga acccccgtt cagcccagc gctgcgcctt atccggaac tctccttg
 528| agtccaacc ggtaagacac gactatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta
 534| gcagagcag gtatgtaggc ggtctacag agttctttaa gtgggtggct aactacggct
 540| acactagaag aacagtaftt ggtatctgc ctctgtgaa gccagtiacc ttcggaaaaa
 546| gagtggtag ctctgatcc ggcaaaaa ccaccgctgg tagcgggtt ttgtttgca
 552| agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tctttgatc tttctacgg
 558| ggtctgacgc tcagtggaa gaaaactcac gtaagggtt ttgtgtcatg agattatcaa 30
 564| aaagatctt cacctagatc ctttaaat aaaaatgaag tttaaatca atctaaagta
 570| tatatagta aacttggct gacagttacc aatgctaat cagtgaggca cctatctcag
 576| cgatctgtct atttcttca tccatagtt cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga
 582| tacgggaggc ctaccatct ggcccagtg ctgcaatgat acccgagac ccaccctcac
 588| cgctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggc
 594| ctgcaactt atccgctcc atccagtcta ttaattgtt cgggaagct agagtaagta
 600| gttgccagt taatagttg cgcaacgtt ttgccattgc tacaggcatc gtgggtcac
 606| gctcgtcgtt tggatggct tcaatcagct cgggtccca acgatcaagg cgagttacat
 612| gatccccat gttgtgaaa aaagcggta gctcctcgg tctccgac gttgtcagaa
 618| gtaagtggc cgcagtgtta tcaatcag ttatggcagc actgcataat tcttctact
 624| tcatgccac cgaagatgc tttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcttctgag 40

6301 aatagtgtat gcgcgaccg agttgctett gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc
 6361 cacatagcag aactftaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttctcggggg cgaaaactct
 6421 caagatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat
 6481 cttcagcadc tttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg
 6541 ccgcaaaaaa ggggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttctttttc
 6601 aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttgaaatga
 6661 tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttc ccgaaaagtg ccacctgacg
 6721 tc

10

【 0 1 6 7 】

【 表 9 】

pcDNA3.1 ADAR2(E488Q) XTEN dCas9 (配列番号 29).

LOCUS Exported 10826 bp ds-DNA circular

DEFINITION synthetic circular DNA

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM synthetic DNA construct

20

REFERENCE 1 (bases 1 to 10826)

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..10826

/organism="synthetic DNA construct"

/mol_type="other DNA"

enhancer 235..614

/label=CMV enhancer

/note="human cytomegalovirus immediate early enhancer"

promoter 615..818

/label=CMV promoter

/note="human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter"

30

promoter 863..881

/label=T7 promoter

/note="promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase"

primer_bind 927..985

/label=H1-ADAR-XTEN_F

misc_feature 927..954

/label=Homology 1_pCDNA3.1

40

CDS 961..2100

/codon_start=1

/label=ADARB1(E488Q)_Catalytic Domain

/translation="MLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLGVVMTTGTQDVKDA

KVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRSLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSI

50

FOKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRKARGQLRTKI
 ESGQGTIPVRSNASIQTWGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFS
 SIILGSLYHGDLHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNW
 TVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHES
 KLAKEYQAARLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQFSLTP"

primer_bind 961..982

/label=Primer 4

primer_bind 1111..1138

/label=Primer 1

10

primer_bind 1440..1478

/label=E488Q_Mutagenesis_F

primer_bind complement(1440..1478)

/label=E488Q_Mutagenesis_R

primer_bind complement(2080..2100)

/label=ADAR2DD_GS_R

primer_bind complement(2080..2100)

/label=Primer 5

CDS 2101..2148

/codon_start=1

/label=XTEN

20

/translation="SGSETPGTSESATPES"

primer_bind complement(2129..2148)

/label=ADAR2_XTEN_R

primer_bind complement(2129..2148)

/label=ADAR2_CD_Inverse_R

primer_bind 2148..2171

/label=Primer 2

CDS 2149..6252

/codon_start=1

/product="catalytically dead mutant of the Cas9
 endonuclease from the Streptococcus pyogenes Type II
 CRISPR/Cas system"

30

/label=dCas9

/note="RNA-guided DNA-binding protein that lacks
 endonuclease activity due to the D10A mutation in the RuvC
 catalytic domain and the H840A mutation in the HNH
 catalytic domain"

/translation="MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPKFKVLGNTDRHSIKK

NLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEES

FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK

40

FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRL
 ENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQ
 IGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR
 QQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL
 RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARG
 NSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDK GASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYEY
 FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD
 SVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EER
 LKTYAHLFDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFANRNF
 QLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA I KKGILQTVKVVDELVKVMGR
 HKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY
 LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVP
 SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH
 VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI TLKSKLVSDFRKDFQFYKVRBINNYHHAHDAYL
 NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKT
 EITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSK
 ESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEK GKSKLKS VKELGI
 TIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE
 LALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKR VILAD
 ANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL
 DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD"

10

20

primer_bind complement(4458..4479)

/label=Primer 3

primer_bind 4879..4899

/label=Primer 6

primer_bind 6252..6273

/label=SaCas9_HA_F

primer_bind 6253..6274

/label=ADAR2_CD_Inverse_F

CDS 6256..6282

/codon_start=1

/product="HA (human influenza hemagglutinin) epitope tag"

/label=HA

/translation="YPYDVPDYA"

primer_bind complement(6274..6296)

/label=AXC_NLSout_NESin_R

primer_bind complement(6274..6294)

/label=NLS_out_R

CDS 6301..6321

/codon_start=1

/product="nuclear localization signal of SV40 large T

30

40

antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"
 CDS 6328..6348
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV" 10

primer_bind complement(6333..6392)
 /label=XTEN-Cas9-H2_R
 primer_bind complement(6333..6377)
 /label=Primer 7
 primer_bind 6347..6371
 /label=NLS_out_NES_full_F
 primer_bind 6349..6371
 /label=AXC_NLSout_NESin_F
 misc_feature 6358..6392
 /label=Homology 2_pCDNA3.1 20

polyA_signal 6426..6650
 /label=bGH poly(A) signal
 /note="bovine growth hormone polyadenylation signal"
 rep_origin 6696..7124
 /direction=RIGHT
 /label=f1 ori
 /note="f1 bacteriophage origin of replication; arrow indicates direction of (+) strand synthesis"
 promoter 7138..7467
 /label=SV40 promoter
 /note="SV40 enhancer and early promoter" 30

rep_origin 7318..7453
 /label=SV40 ori
 /note="SV40 origin of replication"
 CDS 7534..8328
 /codon_start=1
 /gene="aph(3')-II (or nptII)"
 /product="aminoglycoside phosphotransferase from Tn5"
 /label=NeoR/KanR
 /note="confers resistance to neomycin, kanamycin, and G418 (Geneticin(R))" 40

/translation="MIEQDGLHAGSPAAWVERLFGYDWAQQQTIGCSDAAVFRLSAQGRP
 VLFVKTDLSGALNELQDEAARLSWLATTGVPCAAVLDVVTEAGRDWLLLGEVPGDLLS
 SHLAPAEEKVSIADAMRRLHTLDPATCFPDHQAKHRIERARTRMEAGLVDQDDLDEEHQ
 GLAPAELEFARLKARMPDGEDLVVTHGDACLPNIMVENGRFSGFIDCGRLGVADRYQDIA
 LATRDIAEELGGEWADRFLVLYGIAAPDSQRIAFYRLLDEFF"

- polyA_signal 8502..8623
 /label=SV40 poly(A) signal
 /note="SV40 polyadenylation signal" 10
- primer_bind complement(8672..8688)
 /label=M13 rev
 /note="common sequencing primer, one of multiple similar variants"
- protein_bind 8696..8712
 /label=lac operator
 /bound_moiety="lac repressor encoded by lacI"
 /note="The lac repressor binds to the lac operator to inhibit transcription in E. coli. This inhibition can be relieved by adding lactose or isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)." 20
- promoter complement(8720..8750)
 /label=lac promoter
 /note="promoter for the E. coli lac operon"
- protein_bind 8765..8786
 /label=CAP binding site
 /bound_moiety="E. coli catabolite activator protein"
 /note="CAP binding activates transcription in the presence of cAMP."
- rep_origin complement(9074..9659)
 /direction=LEFT 30
 /label=ori
 /note="high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication"
- CDS complement(9830..10690)
 /codon_start=1
 /gene="bla"
 /product="beta-lactamase"
 /label=AmpR
 /note="confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and related antibiotics" 40

```

/translation="MSIQHFRVALIPFFAAFLPVFVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYI
ELDLNSGKILESFRPEERFPMMSSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYS
PVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTITIGGPKELTAFVHNMGDHSVTRLDWR
EPELNEAIPNDERDTTMPVAMATTLRKLTLGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSA
LPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGAS
LIKHW"

```

```

promoter complement(10691..10795)
/gene="bla"
/label=AmpR promoter

```

10

ORIGIN

```

1  gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg
61  cgcgatagtt aagccaglat ctgctccctg ctgtgtgtt ggagtgctg gatgtagtgcg
121 cgagcaaaa ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc
181 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt
241 gattattgac tagttaata tagtaataca ttacggggtc attagttcat agcccatata
301 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc
361 cccgccatt gacgtcaata atgacgtaig ttcccatagt aacgccaata gggactttcc
421 attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgcccc ctggcagta catcaaggt
481 atcatatgcc aagtaagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gctggcatt
541 atgccagta catgacctta tgggacttcc ctacttggca gtacatctac gtattagtca
601 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg
661 actcacgggg attccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc
721 aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgtg acaactccgc cccattgacg caaatgggcg
781 gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca
841 ctgctactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc
901 gtttaaacgg gccctctaga ctgagcggc cggcactgtg ctggatatct gcagagaacc
961 atgttagctg acgtgtctc acgcctggtc ctggtaagt ttggtgacct gaccgacaac
1021 ttctctccc ctacgctcg cagaaaagtg ctggctggag tcgtcatgac aacaggcaca
1081 gatgttaaag atgccaagg gataagtgt tctacaggaa caaatgtat taatggtgaa
1141 tacatgagtg atcgtggcct tgcattaaat gactgccatg cagaataat atctcggaga
1201 tcttctctca gatttcttta tacacaact gagctttact taataacaa agatgatcaa
1261 aaaagatcca tcttcagaa atcagagcga ggggggttta ggctgaagga gaatgtccag
1321 ttcatctgt acatcagcac ctctccctgt ggagatgcca gaatctctc accacatgag
1381 ccaatcctgg aagaaccagc agatagacac ccaatcgtg aagcaagagg acagctacgg
1441 accaaaatag agtctggtca ggggacgatt ccagtgcgct ccaatgagc catccaaacg
1501 tgggacgggg tctgcaagg ggagcggctg ctccatgt cctgcagtga caagattgca
1561 cgctggaacg tgggtggcat ccagggatcc ctgctcagca tttcgtgga gcccafttac
1621 ttctcagca tcctctggg cagcfttac cacggggacc acctttccag ggccatgtac
1681 cagcggatct ccaacataga ggacctgcca ctctctaca cctcaacaa gccfttctc
1741 agtggcatca gcaatgcaga agcacggcag ccagggaagg ccccaactt cagtgtcaac

```

20

30

40

1801 tggacggtag gcgactccgc tattgaggtc atcaacgcca cgactgggaa ggatgagctg
1861 ggccgcgcgt cccgcctgtg taagcacgcg ttgtactgtc gctggatgcg tgtgcacggc
1921 aaggttccct cccactfact acgtccaag attaccaagc ccaacgtgta ccatgagtec
1981 aagctggcgg caaaggagta ccaggccgcc aaggcgcgtc tgttcacagc cttcatcaag
2041 ggggggctgg gggcctgggt ggagaagccc accgagcagg accagtctc actcacgcc
2101 agtggaaagt agacaccggg aacctcagag agcgcacgc cagaaagcat ggacaagaag
2161 tacagcatcg gcctggccat cggcaccaac tctgtgggct gggccgtgat caccgacgag
2221 tacaaggtgc ccagcaagaa attcaaggtg ctgggcaaca ccgaccggca cagcatcaag
2281 aagaacctga tggcgccct gctgttcgac agcggagaaa cagccgaggc caccggctg 10
2341 aagagaaccg ccagaagaag atacaccaga cggagaacc ggatctgcta tctgcaagag
2401 atcttcagca acgagatggc caaggtggac gacagcttct tccacagact ggaagagtcc
2461 ttcctgtggg aagaggataa gaagcacgag cggcaccoca tcttcggcaa catcgtggac
2521 gaggtggcct accacgagaa gtacccacc atctaccacc tgagaagaa actggtggac
2581 agcaccgaca aggccgacct gggctgac tatctggccc tggcccacat gatcaagttc
2641 cggggccact tctgatcga gggcgacct aaccccgaca acagcgact ggacaagctg
2701 tcatccagc tggtcagac ctacaaccag ctgttcgagg aaaacccat caagccagc
2761 ggcgtggacg ccaaggccat cctgtctgcc agactgagca agagcagacg gctggaaaat
2821 ctgatgccc agctccccg cgagaagaag aatggcctgt tggcaacct gattccctg
2881 agcctgggcc tgaccccaa cttcaagagc aacttcgacc tggccgaggg tgccaaactg 20
2941 cagctgagca agacaccta cgacgacgac ctggacaacc tgetggccca gatcggcgac
3001 cagtacccg acctgtttct gggcccaag aacctgtcc agccatcct gctgagcgac
3061 atcctgagag tgaacaccga gatcaccaag gccccctga gcgccttat gatcaagaga
3121 tacgacgagc accaccagga cctgaccctg ctgaaagctc tegtgcggca gcagctgct
3181 gagaagtaca aagagatfff ctctgaccag agcaagaacg gctacgccgg ctacatgat
3241 gggggagcca gccaggaaga gttctacaag tcatcaagc ccatctgga aaagatggac
3301 ggcaccgagg aactgctctg gaagctgaac agagaggacc tegtgcggaa gcagcggacc
3361 ttcgacaacg gcagcatccc ccaccagatc cacctgggag agctgcacgc cattctcgg
3421 cggcaggaag attttacc atctctgaag gacaaccggg aaaagatcga gaagatctg
3481 acctccgca tcccacta cgtgggccct ctggccaggg gaaacagcag atctcctgg
3541 atgaccagaa agagcagga aacctacc cctggaact tcgaggaagt ggtggacaag 30
3601 ggcgccagcg cccagagctt catcgagcgg atgaccaact tcgataagaa cctgcccac
3661 gagaaggtgc tgcccaagca cagcctgctg tacgagtact tcaccgtgta caacgagctg
3721 accaaagtga aatacgtgac cgagggaatg agaaagccc ccttctctgag cggcgagcag
3781 aaaaaagcca tegtggacct gctgttcaag accaaccgga aagtaccct gaagcagctg
3841 aaagaggact acttcaagaa aatcgagtgc ttcgactccg tggaaatctc cggcgtggaa
3901 gatcgttca acgctcct gggcacatac cagatctgc tgaataat caaggacaag
3961 gacttctgg acaatgagga aaacgaggac attctggaag atatctgtct gaccctgaca
4021 ctgtttgagg acagagagat gatcgaggaa cggctgaaaa cctatgcca cctgttcgac
4081 gacaaagtga tgaagcagct gaagcggcgg agataaccg gctggggcag gctgagccgg
4141 aagctgatca acggcatccg ggacaagcag tccgcaaga caatctgga tttctgaag
4201 tccgacggct tcgcaacag aaacttcatg cagctgatcc acgacgacg cctgacctt 40

4261 aaagaggaca tccagaaaagc ccaggtgtcc ggccagggcg atagcctgca cgagcacatt
 4321 gccaatctgg ccggcagccc cgccattaag aagggcatcc tgcagacagt gaaggtgggtg
 4381 gacgagctcg tgaagtgtat ggccggcac aagcccgaga acatcgtgat cgaaatggcc
 4441 agagagaacc agaccacca gaaggacag aagaacagcc gcgagagaat gaagcggatc
 4501 gaagagggca tcaagagct ggccagccag atcctgaaag aacaccccgt ggaaaacacc
 4561 cagctgcaga acgagaagct gtacctgtac tacctgcaga atggcgggga tatgtactgt
 4621 gaccaggaac tggacatcaa ccgctgtcc gactacgatg tggacgctat cgtgcctcag
 4681 agctttctga aggacgactc catcgataac aaagtgtga ctcggagcga caagaaccgg
 4741 ggcaagagcg acaacgtgcc ctccgaagag gtcgtgaaga agatgaagaa ctactggcgc
 4801 cagctgtga atgccaagct gattaccag aggaagtgc acaatctgac caaggccgag 10
 4861 agagcggcc tgaagcgaat ggataaggcc ggcttcatca agagacagct ggtggaacc
 4921 cggcagatca caaagcagct ggcacagatc ctggactccc ggatgaacac taagtacgac
 4981 gagaacgaca aactgatccg ggaagtgaaa gtgatcccc tgaagtcaa gctggtgtcc
 5041 gatttccgga aggatttcca gttttacaaa gtgcgcgaga tcaacaacta ccaccagcc
 5101 cagcagcct acctgaacgc cgtcgtggga accgccctga tcaaaaagta ccctaagctg
 5161 gaaagcgagt tcgtgtaccg cactacaag gtgtacgacg tgcggaagat gatcgccaag
 5221 agcgagcagg aatcggcaa gctaccgcc aagtactct tctacagcaa catcatgaac
 5281 ttttcaaga ccgagattac cctggccaac ggccgagatcc ggaagcggcc tctgatcgag
 5341 acaaacggcg aaacaggcga gatcgtgtgg gataagggcc gggactttgc caccgtgcgg
 5401 aaagtgtgt ctatgcccc agtgaatata gtgaaaaaga ccgaggtgca gacaggcggc 20
 5461 ttacgaaaag agtctatcct gcccaagagg aacagcgaca agctgatgc cagaaagaag
 5521 gactgggacc ctaagaagta cggcggcttc gacagcccc ccgtggccta ttctgtctg
 5581 gtggtggcca aagtggaaa gggcaagtc aagaactga agagtgtgaa agagctgctg
 5641 gggatcacca tcatggaag aagcagcttc gagaagaatc ccatgactt tctggaagcc
 5701 aagggtaca aagaagtga aaaggacctg atcatcaagc tgctaaagta ctccctgttc
 5761 gagctgga aacggccgga gagaatgctg gcctctgccg gcgaactgca gaagggaac
 5821 gaactggccc tccctccaa atatgtgaac ttctgtacc tggccagcca ctatgagaag
 5881 ctgaaggct ccccgagga taatgagcag aaacagctgt ttgtggaaca gcacaacac
 5941 tacctggacg agatcatga gcagatcagc gatttctca agagagtgat cctggccgac
 6001 gctaatctgg acaaggtgct gagcgcctac aacaagcaca gagacaagcc tatcagagag 30
 6061 caggccgaga atatcatcca cctgtttacc ctgaccaatc tgggagcccc tgcgccttc
 6121 aagtactttg acaccacat cgaccggaag aggtacacca gcaccaaga ggtgctggac
 6181 gccacctga tccaccagag catcaccggc ctgtaogaga cacggatcga cctgtctcag
 6241 ctgggagcgc acgctatcc ctatgacgtg cccgattatg ccagcctggg cagcggctcc
 6301 cccaagaaaa aacgcaaggt ggaagatcct aagaaaaagc ggaaagtgga cgtgtaacca
 6361 ccacactgga ctagtggatc cgagctcggg accaagctta agtttaacc gctgatcagc
 6421 ctgactgtg ccttctagt gccagccatc tgtgtttgc ccctccccg tgccttctt
 6481 gaccctgga ggtgccactc cactgtctt ttctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca
 6541 ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga
 6601 ggattggga gacaatagca ggcattctgg ggtatcgggtg ggctctatgg ctctgagc
 6661 ggaaagaacc agctggggct ctagggggta tccccacgc ccctgtagcg gcgcaataag 40

6721 cgcggcgggt gtgggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca ctfgccagcg ccctagcgcg
6781 cgctccttc gcttctcc ctctctct cgcacgctt gccggcttc cccgtcaagc
6841 tctaaatcgg gggtccct tagggctccg atttagtct ttacggcacc tcgacccaa
6901 aaaactgat tagggtagt gttcacgtag tggccatcg cctgataga cggfcttcg
6961 cccttgacg ttggagtcca cgtctttaa tagtggact ttgtccaaa ctggaacaac
7021 actcaacct atctcgtct attcttga ttataaggg atttgccga ttcggccta
7081 ttggttaaaa aatgagctga ttaacaaaa attaacgcg aattaattct gtggaatgtg
7141 tctcagttag ggtgtgaaa gteccagcg tcccagcag gcagaagat gcaaagcatg
7201 catcgaatt agtcagcaac caggtgtgga aagccccag gctcccage aggcagaagt 10
7261 atgcaaaaga tgcattcaa ttatcagca accatagtc ccccctaac tccgccatc
7321 ccgccctaa ctcccccag tccgccat tctccccc atggtgact aatctttt
7381 attatgacg aggccagcg cgcctctgc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc
7441 tttttggag gcttaggct ttgcaaaaag ctcccgggag ctgtatata catttcgga
7501 tctgatcaag agacaggat aggatcgtt cgcattggt aacaagatg attgcacga
7561 ggttcccg ccgctgggt ggagaggcta ttcgctatg actgggcaca acagacaatc
7621 ggctgctct atgcccggt gttccggctg tcagcgcagg ggcgccggg tcttttgc
7681 aagaccgac tgcctgctc cctgaatgaa ctgcaggac aggcagcgc gctatcgtg
7741 ctggccaca cgggcttc ttgcgcagct gtctcagc ttgactga agcgggaagg
7801 gactggctg tttggcgga agtccgggg caggatctc tctatctca cttgctct
7861 gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atcggcggc tgcatacgt tgatccggct 20
7921 acctgccat tcgaccacca agcgaacat cgcctcagc gagcacgtac tggatggaa
7981 gccgcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcag aggggctgc gccagccgaa
8041 ctgttcgcca ggctcaagg gcgatgccc gacggcgagg atctcgtct gacctggc
8101 gatgcctct tcccgaat catggtgga aatggcct tttctgatt catcactgt
8161 ggcggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagct tggctaccg tgatattgt
8221 gaagagctg gggcgcaat ggctgaccg tctctctgc ttacggat ccgctctcc
8281 gattcagc gcctcgcct ctatgcct ctgacgagt tctctgagc gggactctg
8341 ggttcgaaat gaccgacaa gcgacgcca acctgccat acgagattc gattccaccg
8401 ccgctteta tgaagggtg ggcttcgga tcgttccg ggacgccgc tggatgacc
8461 tccagcggg ggatctcat ctggagtct tcccacc caactgtt attgcagct 30
8521 ataatggtta caataaagc aatagcatca caaattcac aataaagca tttttcac
8581 tgcattctag ttgtgttg tccaaactca tcaatgtat ttatcatgtc tctatacgt
8641 cgaccttag cttagcttg gcgtaatcat ggcatagct gttctctgt tgaattgt
8701 atccgctac aattccac aacatacag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg
8761 cctaatgagt gagctaac acattaatg cgttcgctc actgccgct tccagtcgg
8821 gaaacctgt gtccagctg cattaatgaa tggccaacg cgcggggaga ggcggttgc
8881 gtattggcg ctctccgct tctcgtca ctgactcgt gcgctcggc gttcggctc
8941 ggcgagcgg atcagctac taaaggcgg taatacgtt atccacagaa tcaggggata
9001 acgcaggaaa gaacatgtg gcaaaaggc agcaaaaggc caggaacct aaaaaggccg
9061 cgttctggc gttttccat aggtccgccc cctctgacg gcatcacaaa aatgacgct
9121 caagtcagag gtggcgaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgtt cccctggaa 40

9181 gctccctcgt ggetctect gttccgacc tgcgcttac cggataactg tccgcttfc
 9241 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg
 9301 aggtcgttcg ctccaagctg ggcgtgtgac acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg
 9361 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg
 9421 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagtct
 9481 tgaagtgggt gcctaactac ggtcacacta gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc
 9541 tgaagccagt tacctcggg aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg
 9601 ctggtagcgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag 10
 9661 aagatccttt gatctttct acggggctc acgctcagtg gaacgaaaa tcacgttaag
 9721 ggattttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttta aattaaat
 9781 gaagtttaa atcaatctaa agtatatag agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct
 9841 taatcagtga ggcaacctac tcagcgatct gtctatttcg tteatccata gttgctgac
 9901 tcccctcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgcctgcaa
 9961 tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagattatc agcaataaac cagccagccg
 10021 gaagggccga ggcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt
 10081 gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca
 10141 ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccgggt 20
 10201 cccaacgac aagcgcagtt acatgatccc ccatgtgtg caaaaaagcg gttagctct
 10261 tggctctcc gatcgttgc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg
 10321 cagcaactga taattctct actgtcatgc catccgtaag atgctttct gtgactgggt
 10381 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatcggcg accgagttgc tcttggccg
 10441 cgtcaatacg ggataatacc ggcacacata gcagaactt aaaagtctc atcattggaa
 10501 aacgttctc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcagatg
 10561 aaccactcg tgcaccaac tgatctcag catctttac ttcaccagc gttctgggt
 10621 gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt
 10681 gaatactcat actcttctt ttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca 30
 10741 tgagcggata catattgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcccacat
 10801 tccccgaaa agtgccacct gacgct

【 0 1 6 8 】

【 表 1 0 】

pcDNA3.1 ADAR2(E488Q) XTEN コントロール (配列番号 30).

LOCUS Exported 6722 bp ds-DNA circular
 DEFINITION synthetic circular DNA 40
 SOURCE synthetic DNA construct
 ORGANISM synthetic DNA construct
 REFERENCE 1 (bases 1 to 6722)
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..6722
 /organism="synthetic DNA construct"
 /mol_type="other DNA"

```

enhancer    235..614
            /label=CMV enhancer
            /note="human cytomegalovirus immediate early enhancer"
promoter    615..818
            /label=CMV promoter
            /note="human cytomegalovirus (CMV) immediate early
            promoter"
promoter    863..881
            /label=T7 promoter
            /note="promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase"
misc_feature 927..954
            /label=Homology 1_pCDNA3.1
primer_bind 954..976
            /label=ADARB1_lcv2_fw
primer_bind 955..976
            /label=ADAR2CD-Cas9_HindIII_F
primer_bind 958..983
            /label=AXC_lcv2_EFS-NS_fw
primer_bind 960..983
            /label=Adar_out_forward_lv2
CDS         961..2100
            /codon_start=1
            /label=ADARB1(E488Q)_Catalytic Domain

/translation="MLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLGVVMTTGTDVKDA
KVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRSLRFLYQTQLELYLNNKDDQKRSI
FQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILBEPADRHPNRKARGQLRTKI
ESGQGTIPVRSNASIQTDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFS
SIILGSLYHGDHLSTRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNW
TVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMMRVHGKVP SHLLRSKITKPNVYHES
KLAKEYQA AKARLFTAFIKAGLGAWVEKPT EQDQFSLTP"
primer_bind 1324..1346
            /label=E488Q_ADAR2_Mut_seq
primer_bind complement(1426..1447)
            /label=E488Q_Mut_Classic_R
primer_bind 1440..1478
            /label=E488Q_Mutagenesis_F
primer_bind complement(1440..1478)
            /label=E488Q_Mutagenesis_R
primer_bind 1448..1472
            /label=E488Q_Mut_Classic_F

```

10

20

30

40

50

CDS 2101..2148
 /codon_start=1
 /label=XTEN
 /translation="SGSETPGTSESATPES"
 primer_bind complement(2129..2148)
 /label=ADAR2_CD_Inverse_R
 primer_bind 2149..2170
 /label=ADAR2_CD_Inverse_F
 CDS 2152..2178 10
 /codon_start=1
 /product="HA (human influenza hemagglutinin) epitope tag"
 /label=HA
 /translation="YPYDVPDYA"
 primer_bind complement(2170..2192)
 /label=AXC_NLSout_NESin_R
 primer_bind complement(2170..2192)
 /label=Primer 1
 CDS 2197..2217 20
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"
 CDS 2224..2244
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"
 primer_bind 2245..2267 30
 /label=AXC_NLSout_NESin_F
 misc_feature 2254..2288
 /label=Homology 2_pCDNA3.1
 polyA_signal 2322..2546
 /label=bGH poly(A) signal
 /note="bovine growth hormone polyadenylation signal"
 rep_origin 2592..3020
 /direction=RIGHT
 /label=f1 ori
 /note="f1 bacteriophage origin of replication; arrow indicates direction of (+) strand synthesis" 40

promoter 3034..3363
 /label=SV40 promoter
 /note="SV40 enhancer and early promoter"
 rep_origin 3214..3349
 /label=SV40 ori
 /note="SV40 origin of replication"
 CDS 3430..4224
 /codon_start=1
 /gene="aph(3')-II (or nptII)" 10
 /product="aminoglycoside phosphotransferase from Tn5"
 /label=NeoR/KanR
 /note="confers resistance to neomycin, kanamycin, and G418
 (Geneticin(R))"

 /translation="MIEQDGLHAGSPAAWVERLFGYDWAQQTIGCSDAAVFRLSAQGRP
 VLFVKTDLSGALNELQDEAARLSWLATTGVPCA AVL DVVTEAGRDWLLLLGEVPGQDLLS
 SHLAPAEKVSIMADAMRRLHTLDPATCFPDHQA KHRIERARTRMEAGLVDQDDLDEEHQ
 GLAPAE L FARLKARMPDGEDLVVTHGDA CLPNIMVENGRFSGFIDCGRLGVADRYQDIA
 LATRDIAEELGGEWADRFLVLYGIAAPDSQR IAFYRLLDEFF"
 polyA_signal 4398..4519 20
 /label=SV40 poly(A) signal
 /note="SV40 polyadenylation signal"
 primer_bind complement(4568..4584)
 /label=M13 rev
 /note="common sequencing primer, one of multiple similar
 variants"
 protein_bind 4592..4608
 /label=lac operator
 /bound_moiety="lac repressor encoded by lacI"
 /note="The lac repressor binds to the lac operator to 30
 inhibit transcription in E. coli. This inhibition can be
 relieved by adding lactose or
 isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)."
 promoter complement(4616..4646)
 /label=lac promoter
 /note="promoter for the E. coli lac operon"
 protein_bind 4661..4682
 /label=CAP binding site
 /bound_moiety="E. coli catabolite activator protein"
 /note="CAP binding activates transcription in the presence
 of cAMP." 40

```

rep_origin complement(4970..5555)
    /direction=LEFT
    /label=ori
    /note="high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of
    replication"
CDS complement(5726..6586)
    /codon_start=1
    /gene="bla"
    /product="beta-lactamase"
    /label=AmpR
    /note="confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and
    related antibiotics"
/translation="MSIQHFRVALIPFFAAFCCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYI
ELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYS
PVTEKHLTDGMTVRELCSSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFVHNMGDHFVTRLDRW
EPPELNEAIPNDERD'TTMPVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSAL
LPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGAS
LIKHW"
promoter complement(6587..6691)
    /gene="bla"
    /label=AmpR promoter
ORIGIN
    1 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgactct cagtacaatc tgctctgatg
    61 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg
    121 cgagcaaaa ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc
    181 ttagggtag gcgttttcgc ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacy cgttgacatt
    241 gattattgac tagtattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata
    301 tggagttcgg cgttacataa cttacggtaa atggccgcc tggctgaccg cccaacgacc
    361 cccgcccaat gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggacttcc
    421 attgacgta atgggtggag tatttacggt aaactgcccc ctggcagta catcaagtgt
    481 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt
    541 atgcccagta catgacctta tgggacttcc ctacttgcca gtacatctac gtattagtea
    601 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg
    661 actcacgggg atttcaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc
    721 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg
    781 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca
    841 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc
    901 gtttaaacgg gccctctaga ctgagcggc cgccactgtg ctggatatct gcagagaacc
    961 atgtagctg acgctgtctc acgctgtgct ctgggtaagt ttggtgacct gaccgacaac
    1021 ttctctccc ctacgctcg cagaaaagtg ctggctggag tcgtcatgac aacaggcaca

```

1081 gatgttaaag atgccaaggt gataagtgtt tctacaggaa caaaatgtat taatggtgaa
 1141 tacatgagtg atcgtggcct tgcattaat gactgccatg cagaataat atctcggaga
 1201 tccttgctca gatttctta tacacaactt gagctttact faataacaa agatgatcaa
 1261 aaaagatcca tcttcagaa atcagagcga ggggggttta ggctgaagga gaatgtccag
 1321 tticatctgt acatcagcac ctctccctgt ggagatgcca gaatctctc accacatgag
 1381 ccaatcctgg aagaaccagc agatagacac ccaatcgtta aagcaagagg acagctacgg
 1441 accaaaatag agtctggta ggggacgatt ccagtgcgct ccaatgcgag catccaaacg
 1501 tgggacgggg tgctgcaagg ggagcggctg ctccatctg cctgcagtga caagattgca
 1561 cgtggaacg tgggggcat ccagggatcc ctgctcagca tttctgtgga gcccafttac 10
 1621 ttctcagca tcactcggg cagcctttac cacggggacc accttcacg ggccatgtac
 1681 cagcggatct ccaacataga ggacctgcca cctcttaca ccctcaacaa gcctttgctc
 1741 agtggcatca gcaatgcaga agcacggcag ccaggggaagg ccccaactt cagtgtcaac
 1801 tggacggtag gcgactccg tattgaggtc atcaacgcca cgactgggaa ggatgagctg
 1861 ggccgcgctg cccgctgtg taagcacgcg ttgtactgtc gctggatgag tgtgcacggc
 1921 aaggttcct cccacttact acgtccaag attaccaag ccaactgtgta ccatgagtc
 1981 aagctggcgg caaaggagta ccagggccc aaggcgcgtc tttcacagc ctcatcaag
 2041 gggggctgctg gggcctgggt ggagaagccc accgagcagg accagtctc actcacgcc
 2101 agtggaaagt agacaccggg aacctcagag agcggcacgc cagaagcgc ctatccctat
 2161 gacgtgcccg attatgccag cctgggcagc ggctcccca agaaaaaacg caaggtggaa
 2221 gatcctaaga aaaagcggaa agtggacgtg taaccaccac actggactag tggatccgag 20
 2281 ctcggtacca agcttaagt faaacgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagtgtcca
 2341 gccatctgtt gttgcccct ccccgtgcc ttcttgacc ctggaaggtg ccactccac
 2401 tgtctttcc taataaatg aggaattgc atgcattgt ctgagtaggt gtcattctat
 2461 tctgggggtt ggggtggggc aggacagca gggggaggat tgggaagaca atagcaggca
 2521 tgctgggatg gcggtggct ctatggctc tgaggcggaa agaaccagct ggggcttag
 2581 ggggtatccc cagcgcctt gtagcggcgc ataaagcgc gcgggtgtgg tggtagcgcg
 2641 cagcgtgacc gctacactg ccagcgcct agcgcctgct ccttctgctt tcttccctc
 2701 cttctcgcc acgttcgctg gcttccccg tcaagcteta aatcgggggc tcctttagg
 2761 gttccgattt agtctttac ggcacctga ccccaaaaaa ctgaltagg gtagtggtc
 2821 acgtagtggg ccatgcccct gatagcgggt tttctgccc ttgacgttgg agtccagtt 30
 2881 cttaaatgt ggactctgt tccaaactgg aacaacact aacctatct cgtctattc
 2941 tttgattha taagggtt tgcgattt gcctattgg taaaaaatg agctgattt
 3001 acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtg aatgtgtg agttagggtg tggaaagtcc
 3061 ccagctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcate tcaattagtc agcaaccagg
 3121 tgtgaaagt cccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag
 3181 tcagcaacca tagtcccgc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc
 3241 gccattctc cccccatgg ctgactaatt tttttatt atgcagaggc cgaggccgc
 3301 tctgctctg agctattcca gaagtatgga ggaggcttt ttggaggcct aggttttgc
 3361 aaaaagctcc cgggagctt tatatccatt ttcggatctg atcaagagac aggatgagga
 3421 tegtctgca tgaftgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag
 3481 aggtattcgc gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cggctgttc 40

354l cggctgtcag cgcagggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg
 360l aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc
 366l gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgtctatt gggcgaagtg
 372l cggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct
 378l gatgcaatgc ggcgctgca tacgctgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg
 384l aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgcga tcaggatgat
 390l ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc
 396l atgcccagcg gcgaggtatc cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttccc gaatatcatg
 402l gtggaaaatg gccgctttc tggattcacc gactgtggcc ggctgggtgt ggccggaccg 10
 408l tatcaggaca tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct
 414l gaccgctcc tcgtcttca cggtatcgc gctcccatt cgcagcgcac cgccttctat
 420l ccctctctg acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt cgaatgacc gaccaagcga
 426l cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgcgc ctctatgaa aggttgggct
 432l tcggaatcgt ttccgggac gccggctgga tgatctcca gcgcggggat ctcatgctgg
 438l agttctcgc ccacccaac ttgtttatg cagctataa tggftacaa taaagcaata
 444l gcatcacaat tttcacaat aaagcattt ttctactgca ttctagtgt ggtttgcca
 450l aactcatcaa tgtatctat catgtctgta taccgtcgc ctctagctag agcttggcgt
 456l aatcatggc atagctgtt cctgtgtgaa attgtatcc gtcacaatt ccacacaaca
 462l tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat
 468l taattgcgtt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt 20
 474l aatgaatcgg ccaacgcgc gggagaggcg gtttgcgtat tggcgctct tccgcttct
 480l cgtcactga ctgcgtcgc tcggtcgtt ggctgcggcg agcggatca gctcactcaa
 486l aggcggtaat acggtatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa
 492l aaggccagca aaagccagg aaccglaaaa agcccgctt gctggcgtt ttccataggc
 498l tccgcccc tgacgagcat cacaaaaac gacgtcaag tcagaggtgg cgaaccgca
 504l caggactata aagataccag gcgttcccc ctggaagctc cctcgtcgc tctcctgtt
 510l cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc ttcgggaagc gtggcgctt
 516l ctcatagctc acgctgtagg tatctcagt cgggttaggt cgttcgctcc aagctgggct
 522l gtgtcacga acccccgtt cagcccagc gctgcgctt atccggtaac tctcgtctg
 528l agtccaacce ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta 30
 534l gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttctttaa gtggtggcct aactacggct
 540l aactagaag aacagtattt ggtatctgc ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa
 546l gatttggtag ctcttgatcc ggcaaaaa ccaccgctgg tagcggttt ttgtttgca
 552l agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tctttgatc tttctacgg
 558l ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtaagggat tttgctcatg agattatcaa
 564l aaagatctt cacctagatc ctttaaat aaaaatgaag ttttaata atctaaagta
 570l tatatgagta aacttggct gacagttacc aatgctaat cagtgaggca cctatctcag
 576l cगतctgtct atttcttca tccatgttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga
 582l tacgggaggc cttaccatct ggcccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac
 588l cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggct
 594l ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta ttaattgtt cgggaagct agagtaagta 40

6001 gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac
 6061 gctcgtggtt tggatggct tcattcagct ccggttcca acgatcaagg cgagttacat
 6121 gatccccat gttgtgcaaa aaagcggta gctccttcgg tctccgatc gttgtcagaa
 6181 gtaagttggc cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc actgcataat tctctactg
 6241 tcatgccatc cgtaaatgc tttctgtga ctggtagta ctcaaccaag tcattctgag
 6301 aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gccggcgtc aatacgggat aataccgcgc
 6361 cacatagcag aacttataaa gtgctcatca ttggaaaacg ttctcgggg cgaaaactct
 6421 caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat
 6481 cttcagcatc tttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg
 6541 ccgcaaaaaa ggggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcttttc
 6601 aatattattg aagcattat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttgaaatga
 6661 tttagaaaaa taacaaata ggggttccgc gcacattcc cggaaaagtg ccacctgacg
 6721 tc

10

【 0 1 6 9 】

【 表 1 1 】

50bp GFP mCherry 延長部 (配列番号 31).

20

LOCUS Exported 4951 bp ds-DNA circular

DEFINITION synthetic circular DNA

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM recombinant plasmid

REFERENCE 1 (bases 1 to 4951)

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..4951

/organism="recombinant plasmid"

/mol_type="other DNA"

30

primer_bind 1..40

/label=EF1a_Gibson_F

primer_bind 1..20

/label=Primer 2

misc_feature 1..7

/label=sgRNA scaffold_termination

promoter 21..566

/label=EF1a promoter

primer_bind complement(554..591)

/label=EF1a_Gibson_R

40

CDS 572..1282

/codon_start=1

/product="monomeric derivative of DsRed fluorescent protein
(Shaner et al., 2004)"

50

```

/label=mCherry
/note="mammalian codon-optimized"

/translation="MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG
TQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSF'PEGFKWERVMNF
EDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK
GEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIIVEQYERA
EGRHSTGGMDELYK"
  primer_bind 572..591 10
    /label=mCherry_BGH_F
  primer_bind complement(1259..1306)
    /label=Primer 1
  primer_bind complement(1259..1286)
    /label=mCherry_P2A_Gib_R
  primer_bind complement(1259..1282)
    /label=mCherry_HindIII_R
  misc_feature 1283..1306
    /label=Gibson Overlap
  primer_bind 1283..1301 20
    /label=mCherry_P2A_Gib_F
  polyA_signal 1330..1554
    /label=bGH poly(A) signal
    /note="bovine growth hormone polyadenylation signal"
  primer_bind complement(1535..1573)
    /label=mCherry_BGH_Gib_R
  primer_bind complement(1535..1554)
    /label=mCherry_BGH_R
  primer_bind complement(1536..1555)
    /label=bGH_NotI_R
  primer_bind complement(1558..1573) 30
    /label=SK primer
    /note="common sequencing primer, one of multiple similar
    variants"
  primer_bind complement(1608..1627)
    /label=T3
  primer_bind complement(1645..1665)
    /label=M13-rev
  misc_binding complement(1671..1693)
    /label=LacO
  promoter complement(1698..1727) 40
    /label=lac

```

rep_origin complement(2033..2661)
 /direction=LEFT
 /label=ColeE1 origin
 CDS complement(2813..3472)
 /label=AmpR
 promoter complement(3712..3740)
 /label=Amp prom
 rep_origin 3811..4251
 /direction=RIGHT
 /label=F1 ori 10
 CDS complement(4258..4326)
 /label=LacZ alpha
 primer_bind 4397..4414
 /label=M13-fwd
 primer_bind 4424..4443
 /label=T7
 promoter 4555..4817
 /label=U6 promoter
 primer_bind 4798..4864
 /label=no_spacer_universal_scaff_f 20
 primer_bind 4803..4862
 /label=50bp_GFP_F
 primer_bind 4803..4862
 /label=50bp_GFP_revcomp_F(+G)
 primer_bind 4803..4862
 /label=10bp_GFP_spacer_F
 primer_bind 4803..4862
 /label=30bp_GFP_spacer_F
 primer_bind 4803..4862
 /label=70bp_GFP_spacer_F 30
 primer_bind 4803..4862
 /label=ACTB_3_ext_CgRNA_For
 primer_bind complement(4803..4817)
 /label=Primer 3
 primer_bind complement(4803..4817)
 /label=extension_gibson_R
 misc_feature 4818..4838
 /label=50bp_EGFP_targeting_spacer
 misc_feature 4839..4924
 /label=sgRNA scaffold
 primer_bind 4839..4865 40


```

        /label=scaffold_3_ext_template_For
primer_bind  complement(4912..4930)
        /label=scaffold_3_ext_template_Rev
primer_bind  complement(join(4913..4951,1..20))
        /label=eGFP_3_ext_R
primer_bind  complement(join(4913..4951,1..20))
        /label=gfp_3_extension_revcomp
primer_bind  complement(join(4913..4951,1..20))
        /label=ACTB_3_ext_AgRNA_Rev
misc_feature 4925..4930
        /label=Linker
misc_feature 4931..4951
        /label=EGFP_extension

```

10

ORIGIN

```

1  ttttttct gcagcccggg aaggatctgc gatcgtccg gtgcccgtca gtgggcagag
61  cgcacatcgc ccacagctcc cgagaagtgg gggggagggg tggcaattg aacgggtgcc
121 tagagaaggt ggcgcggggg aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgcctttt
181 cccgaggggt ggggagaacc gtatataagt gcagtagtgc cgtgaacgt tcttttgc
241 aacgggttgg ccgccagaac acagctgaag ctcgagggg ctcgcatctc tcttcacgc
301 gcccgcgcc ctacctgagg ccgcatcca cgcgggtga gtcgcttct gccgcctccc
361 gctgtgtgg cctcctgaac tgcgtccgc gtctaggtaa gtttaagct caggtcgaga
421 cggggccttt gtcggcgcct cccttggagc ctacctagac tcagccggct ctccacgctt
481 tgcctgacct tgcctgctca actctacgtc tttgttctg tttctgtct gcgcccgttac
541 agatccaagc tgtgaccggc gcctacgcta gatggtgagc aaggcgagg aggataacat
601 ggcatcatc aaggagtca tgccttcaa ggtgcacatg gagggctccg tgaacggcca
661 cgagttcgag atcgagggcg agggcgaggg ccgcccctac gagggcacc agaccgcaa
721 gctgaagggtg accaagggtg gcccctgcc ctgcctgg gacatcctgt ccctcagtt
781 catgtacggc tccaaggcct acgtgaagca ccccgccgac atccccgact actgaagct
841 gtcctcccc gagggctca agtgggagcg cgtgatgaac ttcgaggacg gcggcgtggt
901 gaccgtgacc caggactcct ccctgcagga cggcgagttc atctacaagg tgaagctcgc
961 cggcaccaac tcccctccg acggccccgt aatgcagaag aagaccatgg gctgggaggc
1021 ctctccgag cggatgtacc ccgaggacgg cgcctgaag ggcgagatca agcagaggct
1081 gaagctgaag gacggcggcc actacgacgc tgaggtcaag accacctaca aggccaagaa
1141 gcccgtgcag ctgcccggcg cctacaactg caacatcaag ttggacatca cctcccacia
1201 cgaggactac accatcgtgg aacagtacga acgcccggag gggcggcact ccaccggcgg
1261 catggacgag ctgtacaagt aatccgagct cggtagcaag ctttaagtta aaccgctgat
1321 cagcctgcac tgtgccttct agttgccagc catctgtgtg ttcccctcc cccgtgcctt
1381 ccttgacctt ggaaggtgcc actcccactg tcttctcta ataaaatgag gaaattgcat
1441 cgcattgtct gagtagtgtt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg
1501 gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atgggggatc
1561 cactagttct agagcgccg ccaccgcggt ggagctccag cttttgttc ctttagtgag

```

20

30

40

50

1621 ggtaattgc ggccttggcg taatcatggt catagctgtt tctgtgtga aattgttate
 1681 cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgcct
 1741 aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgccttc cagtcgggaa
 1801 acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta
 1861 ttggcgctc ttcgcttcc tcgctcactg actcgcctgcg ctcggctcgtt cggctgcggc
 1921 gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg
 1981 caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt
 2041 tgctggcgtt ttccatagg ctcgcccc ctagcagca tcacaaaaat cgacgctcaa
 2101 gtcagaggtg gcgaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgttccc cctggaagct 10
 2161 ccctcgtcgc ctctctgtt cggacctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctc
 2221 ctccgggaag cgtggcgtt tctcatagct cagcgttag gtatctcagt tcggttagg
 2281 tcgttcgctc caagctgggc tgtgtcacg aacccccgt tcagccgac cgtcgcgct
 2341 tatccgtaa ctatctctt gactcaacc cggtaagaca cgactatcg cactggcag
 2401 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gattcttga
 2461 agtggtgccc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctgc gctctgctga
 2521 agccagtac ctccgaaaa agagttgta gctctgac cggcaaaaa accaccgctg
 2581 gtacgggtg tttttgtt tgcaagcagc agattacgc cagaaaaaa ggtctcaag
 2641 aagatcttt gatctttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaac tcacgttaag
 2701 ggattttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatctttta aaitaaaaat
 2761 gaagtttaa atcaatctaa agtatatat agtaaactg gtctgacagt taccaatgct 20
 2821 taatcagtga ggcacctatc tcagcgtct gtctatttcg tcatccata gttgctgac
 2881 tccccgctg gtatagaaact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa
 2941 tgataccgagc agaccacgc tcaccggctc cagattatc agcaataaac cagccagccg
 3001 gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctctaccgc ctccatccag tctattaatt
 3061 gttgcccggga agctagagta agtagtgcg cagtaatag tttgcgcaac gttgtgcca
 3121 ttgctacagg catcgtggg tcacgctcgt cgtttggtat ggcctcattc agctccggt
 3181 cccaacgatc aaggcgagt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg gtagctcct
 3241 tcggctctcc gatcgtgtc agaagtaagi tggccgcagt gttatcactc atgggtatgg
 3301 cagcactgca taattctct actgtcatgc catccgtaag atgctttct gtagctggg
 3361 agtactcaac caagtcattc tgagaatagi gtatggcgcg accgagttgc tctgcccgg 30
 3421 cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaactt aaaagtgtc atcattggaa
 3481 aacgttctc ggggcgaaaa ctctcaagga tctaccgct gttgagatcc agttcagatg
 3541 aaccactcg tcaccaaac tgatctcag catctttac ttcaccagc gttctgggt
 3601 gagcaaaaac aggaaggcaa aatccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt
 3661 gaatactcat actctcctt ttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca
 3721 tgagcggata cataattgaa tttattaga aaataaaca aataggggt cgcgcacat
 3781 tccccgaaa agtgccacct aattgtaag cgtaaatatt ttgtaaaa tcgctgtaaa
 3841 ttttgttaa atcagctcat ttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa tccctataa
 3901 atcaaaagaa tagaccgaga taggggtgag tttgttcca gtttgaaca agagtccact
 3961 attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc
 4021 actacgtgaa ccatcacct aatcaagtt tttgggtcgc aggtgccgta aagcactaaa 40

4081 tcggaaccct aaagggagcc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc
 4141 gagaaaggaa ggggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggg
 4201 cagctgcgc gtaaccacca caccgccgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgctgcca
 4261 ttgccattc aggctgcgca actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct ctccgctatt
 4321 acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt
 4381 ttccagtcg cgacgttga aaacgacggc cagtgagcgc gcgtaatacg actcactata
 4441 gggcgaattg ggtaccgggc cccccctega ggtcgacggg atcgataagc ttgatatcgt
 4501 gtacaaaaaa gcagccttta aaggaaccaa ttcagtcgac tggatccggg accaaggctg
 4561 ggcaggaaga gggcctatct cccatgattc ctccatattt gcatatacga tacaaggctg
 4621 ttagagagat aattagaatt aattgactg taaacacaaa gatattagta caaaatcgt
 4681 gacgtagaaa gtaataatct cttgggtagt ttgcagttt aaaattatgt tttaaatgg
 4741 actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta tatatctgt
 4801 ggaaaggacg aaacaccgaa gtcatgccgt ttcattgtgg ttaagagcta tgctggaaac
 4861 agcatagcaa gtttaataa ggctagtcg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg
 4921 gtgcttcatt gtgctggcca cggaacaggc a

10

【 0 1 7 0 】

【 表 1 2 】

20

λ⁺-サーリス GFP mCherry 延長部 (配列番号 32).

LOCUS Exported 4930 bp ds-DNA circular

DEFINITION synthetic circular DNA

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM recombinant plasmid

REFERENCE 1 (bases 1 to 4930)

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..4930

/organism="recombinant plasmid"

/mol_type="other DNA"

rep_origin 13..453

/direction=RIGHT

/label=F1 ori

CDS complement(460..528)

/label=LacZ alpha

primer_bind 599..616

/label=M13-fwd

primer_bind 626..645

/label=T7

promoter 757..1019

/label=U6 promoter

primer_bind complement(998..1019)

/label=scaffold_out_R

primer_bind 1000..1045

30

40

50

```

        /label=no_spacer_universal_scaff_f
primer_bind 1005..1043
        /label=50bp_GFP_F
primer_bind 1005..1043
        /label=ACTB_3_ext_CgRNA_For
misc_feature 1020..1105
        /label=sgRNA scaffold
primer_bind 1020..1046
        /label=scaffold_3_ext_template_For
primer_bind complement(1093..1111)
        /label=scaffold_3_ext_template_Rev
primer_bind complement(1094..1152)
        /label=eGFP_3_ext_R
primer_bind complement(1094..1152)
        /label=gfp_3_extension_revcomp
primer_bind complement(1094..1152)
        /label=ACTB_3_ext_AgRNA_Rev
misc_feature 1106..1111
        /label=Linker
misc_feature 1112..1132
        /label=EGFP_extension
primer_bind 1133..1172
        /label=EF1a_Gibson_F
primer_bind 1133..1152
        /label=3_ext_backbone_For
misc_feature 1133..1139
        /label=sgRNA scaffold termination
promoter 1153..1698
        /label=EF1a promoter
primer_bind complement(1686..1723)
        /label=EF1a_Gibson_R
CDS 1704..2414
        /codon_start=1
        /product="monomeric derivative of DsRed fluorescent protein
        (Shaner et al., 2004)"
        /label=mCherry
        /note="mammalian codon-optimized"

/translation="MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEG
TQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADI PDYLKLSFPEGFKWERVMNF
EDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK

```

GEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIIVEQYERA
EGRHSTGGMDELYK"

primer_bind 1704..1723
/label=mCherry_BGH_F
primer_bind complement(2391..2438)
/label=Primer 1
primer_bind complement(2391..2414)
/label=mCherry_HindIII_R
misc_feature 2415..2438 10
/label=Gibson Overlap
polyA_signal 2462..2686
/label=bGH poly(A) signal
/note="bovine growth hormone polyadenylation signal"
primer_bind complement(2667..2705)
/label=mCherry_BGH_Gib_R
primer_bind complement(2667..2686)
/label=mCherry_BGH_R
primer_bind complement(2668..2687)
/label=bGH_NotI_R
primer_bind complement(2690..2705) 20
/label=SK primer
/note="common sequencing primer, one of multiple similar
variants"
primer_bind complement(2740..2759)
/label=T3
primer_bind complement(2777..2797)
/label=M13-rev
misc_binding complement(2803..2825)
/label=LacO
promoter complement(2830..2859) 30
/label=lac
rep_origin complement(3165..3793)
/direction=LEFT
/label=ColE1 origin
CDS complement(3945..4604)
/label=AmpR
promoter complement(4844..4872)
/label=Amp prom

ORIGIN

1 ctaaattgta agcgttaata tttgttaaa attcgcgta aattttgtt aaatcagctc
61 atttttaac caataggccg aatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 40

121 gatagggttg agtgtgttc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactic
 181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc cactacgtg aaccatcacc
 241 ctaatcaagt ttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag
 301 cccccgatt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa
 361 agcgaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac
 421 cacaccgcc gcgctaatg gcgcgtaca gggcgctcc cattgccat tcaggctgcg
 481 caactgttg gaagggcgat cggfvcgggc ctctcgcta ttacgccage tggcgaaggg
 541 gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg tttccagc cagcagctg
 601 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactacta tagggcgaat tgggtaccgg 10
 661 gccccccctc gaggtcgagc gtatcgataa gcttgatc gtgtacaaa aagcaggctt
 721 taaaggaacc aatcagtcg actggatccg gtaccaaggt cgggcaggaa gagggcctat
 781 ttccatgat tcttcatat ttgcatatac gatacaaggc tggtagagag ataattagaa
 841 ttaattgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga aagtaataat
 901 ttctgggta gtttcagtt ttaaattat gtttfaaat ggactatcat atgcttaccg
 961 taacttgaat gtattcgat ttcttgctt tatatatctt gtgaaagga cgaaacaccg
 1021 ttaagagct atgctggaaa cagcatagca agttaaata aggctagtc gttatcaact
 1081 tgaaaaagt gcaccgagtc ggtcttcat tgtctggcc acggaacagg cattttttc
 1141 ctgcagcccc ggaaggatct cgcgctcgc cggfvcctc cagtgggcag agcgcacatc
 1201 gcccacagtc cccgagaagt tggggggagg ggtcggcaat tgaacgggtg cctagagaag 20
 1261 gtggcgcggg gtaaaactgg aaagtgatgt cgtgactgg ctccgcttt tcccagggg
 1321 tgggggagaa ccgtatataa gtgcagtagt cggcgtgac gttcttttc gcaacgggtt
 1381 tgccgccaga acacagctga agcttcagg ggctcgcac tctcttccac gcgccccggc
 1441 ccctacctga ggcgccatc cagccgggtt gactcgcgt ctgccgccic ccgctgtgg
 1501 tgcctctga actgcgtcc cgtctaggt aagttfaag ctacagtcga gaccgggctt
 1561 ttgtccggc ctcccttga gctacctag actcagccgg ctctccacgc ttgcttgac
 1621 cctgctgct caactctacg tctttgttc gtttctgt ctgcgccgtt acagatcaa
 1681 gctgtgaccg gcgcctacgc tagatggtga gcaagggcga ggaggataac atggccatca
 1741 tcaaggagtt catgcctc aaggtgcaca tggagggtc cgtgaacggc cagcagttc
 1801 agatcgaggg cgagggcgag ggccgcccct acgagggcac ccagaccgc aagctgaagg
 1861 tgaccaaggg tggccccctg ccttccctt gggacatct gcccctcag ttcatgtacg 30
 1921 gctccaaggc ctacgtgaag cccccgccc acatccccga ctactgaag ctgtcttcc
 1981 ccgagggctt caagtgggag cgcgtgatga acttcagga cggcggcgtg gtgaccgtga
 2041 cccaggactc ctccctcag gacggcgagt tcactacaa ggtgaagctg cgcggcacca
 2101 acttccctc cgacggccc gtaatgcaga agaagaccat gggctgggag gcctctccg
 2161 agcggatgta ccccgaggac ggcgcccga agggcgagat caagcagagg ctgaagctga
 2221 aggacggcgg cactacgac gctgaggta agaccaccta caaggccaag aagcccgtgc
 2281 agctgcccgg cgcctacaac gtaacatca agttggacat cacctccac aacgaggact
 2341 acaccatct ggaacagtac gaacgcgcc agggccgcca ctccaccggc ggcatggacg
 2401 agctgtacaa gtaatccgag ctcggtacca agcttaagt taaaccgctg atcagctc
 2461 actgtgctt ctagtcca gccatctgt gtttcccc ccccgtgccc ttcttgacc
 2521 ctggaaggtg cactccac tctcttcc taataaatg aggaaattgc atcgattg 40

2581 ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat
 2641 tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggggga tccactagtt
 2701 ctagagcggc cgccaccgcg gtggagctcc agcttttgtt ccctttagtg agggftaatt
 2761 gcgcgcttgg cgtaatcatg gtcatactg tttctgtgt gaaattgta tccgctcaca
 2821 attccacaca acatacagagc cggaaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg
 2881 agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg
 2941 tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggttgcg fattgggcgc
 3001 tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg ttcggctgcg gcgagcggta
 3061 tcagctcact caaaggcgtt aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 10
 3121 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg
 3181 ttttccata gctcggccc cctgacgag catcacaata ategacgctc aagttagagg
 3241 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgttc ccctggaag ctccctcgtg
 3301 cgtctctctg ttcggacct gccgcttacc ggatacctgt ccgctttct ccctcggga
 3361 agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc
 3421 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc ctatccggt
 3481 aactatgctc ttgagtcaa cccgtaaga cagacttat cggcactggc agcagccact
 3541 ggtaacagga tttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagtctt gaagtgggtg
 3601 cctaactacg gctacactag aaggacagta ttggtatct gcgctctgct gaagccagtt
 3661 acctcggaa aaagagttgg tagctctga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 20
 3721 ggtttttt tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatct
 3781 ttgatcttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgta agggatttg
 3841 gtcatagat tatcaaaaag gatcttacc tagatcttt taaatfaaa atgaagttt
 3901 aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt
 3961 gaggcacctc tctcagcgt ctgtctatt cgttcatca tagttgctg actcccgtc
 4021 gtgtagataa ctacgatac ggagggtta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg
 4081 cgagaccac gctcaccggc tccagatta tcagcaataa accagccagc cggaaaggcc
 4141 gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gctccatcc agtctattaa ttgtgcccg
 4201 gaagctagag taagtagtc gccagtaat agttgcgca acgttgtgc cattgctaca
 4261 ggcacgtgg tgcacgctc gtcgttggg atgcttcat tcagctccgg ttccaacga
 4321 tcaaggcgag ttacatgac cccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc ctccggtct 30
 4381 ccgatcgtt tcagaagta gttggccga gtgtatcac tcatgggtat ggcagcactg
 4441 cataattctc ttactgcat gccatccgta agatctttt ctgtactgg tgagtactca
 4501 accaagtcac tctgagaata gtgtatcgg cgaccgagtt gctcttccc ggcgtcaata
 4561 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact taaaagtgc tcatattgg aaaacgttct
 4621 tggggcgaa aactctcaag gatcttacc ctggtgagat ccagttcgt gtaaccact
 4681 cgtgcacca actgatctc agcatcttt actttacca gcgttctgg gtgagcaaaa
 4741 acaggaaggc aaaatgccg aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc
 4801 atactctcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg gtattgtct catgagcggg
 4861 tacataattg aatgtatita gaaaaataa caaatagggg tccgcgcac atttcccga
 4921 aaagtccac 40

【 0 1 7 1 】

【表 1 3】

GFP no spacer revcomp mCherry キット (配列番号 33).

LOCUS	Exported	4930 bp ds-DNA	circular	
DEFINITION	synthetic circular DNA			
SOURCE	synthetic DNA construct			
ORGANISM	recombinant plasmid			
REFERENCE	1 (bases 1 to 4930)			
FEATURES	Location/Qualifiers			
source	1..4930			
		/organism="recombinant plasmid"		10
		/mol_type="other DNA"		
primer_bind	1..20			
		/label=Primer 2		
misc_feature	1..7			
		/label=sgRNA scaffold termination		
promoter	21..566			
		/label=EF1a promoter		
primer_bind	complement(554..591)			
		/label=EF1a_Gibson_R		
CDS	572..1282			20
		/codon_start=1		
		/product="monomeric derivative of DsRed fluorescent protein (Shaner et al., 2004)"		
		/label=mCherry		
		/note="mammalian codon-optimized"		
	/translation="MVSKEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG			
	TQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNF			
	EDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK			
	GEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIIVEQYERA			
	EGRHSTGGMDELYK"			
				30
primer_bind	572..591			
		/label=mCherry_BGH_F		
primer_bind	complement(1259..1306)			
		/label=Primer 1		
primer_bind	complement(1259..1282)			
		/label=mCherry_HindIII_R		
misc_feature	1283..1306			
		/label=Gibson Overlap		
polyA_signal	1330..1554			
		/label=bGH poly(A) signal		
		/note="bovine growth hormone polyadenylation signal"		40


```

primer_bind    complement(1535..1573)
                /label=mCherry_BGH_Gib_R
primer_bind    complement(1535..1554)
                /label=mCherry_BGH_R
primer_bind    complement(1536..1555)
                /label=bGH_NotI_R
primer_bind    complement(1558..1573)
                /label=SK primer
                /note="common sequencing primer, one of multiple similar
                variants"
                10
primer_bind    complement(1608..1627)
                /label=T3
primer_bind    complement(1645..1665)
                /label=M13-rev
misc_binding   complement(1671..1693)
                /label=LacO
promoter       complement(1698..1727)
                /label=lac
rep_origin     complement(2033..2661)
                /direction=LEFT
                /label=ColE1 origin
                20
CDS            complement(2813..3472)
                /label=AmpR
promoter       complement(3712..3740)
                /label=Amp prom
rep_origin     3811..4251
                /direction=RIGHT
                /label=F1 ori
CDS            complement(4258..4326)
                /label=LacZ alpha
                30
primer_bind    4397..4414
                /label=M13-fwd
primer_bind    4424..4443
                /label=T7
promoter       4555..4817
                /label=U6 promoter
primer_bind    4798..4843
                /label=no_spacer_universal_scaff_f
primer_bind    4803..4841
                /label=ACTB_3_ext_CgRNA_For
primer_bind    complement(4803..4817)
                40

```

```

        /label=Primer 3
primer_bind    complement(4803..4817)
        /label=extension_gibson_R
misc_feature   4818..4903
        /label=sgRNA scaffold
primer_bind    4818..4844
        /label=scaffold_3_ext_template_For
primer_bind    complement(4891..4909)
        /label=scaffold_3_ext_template_Rev
primer_bind    complement(join(4892..4930,1..20))
        /label=gfp_3_extension_revcomp
primer_bind    complement(join(4892..4930,1..20))
        /label=ACTB_3_ext_AgRNA_Rev
misc_feature   4904..4909
        /label=Linker
misc_feature   4910..4930
        /label=EGFP_revcomp_extension
primer_bind    join(4930,1..40)
        /label=EF1a_Gibson_F
ORIGIN
1 ttttttct gcagccggg aaggatctgc gatcgctccg gtgcccgca gtgggcagag
61 cgcacatgc ccacagtccc cgagaagtgc gggggagggg tcggcaattg aacgggtgcc
121 tagagaaggt ggcgcggggg aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgcctttt
181 cccgaggggt ggggagaacc gtatataagt gcagtagtgc cegtgaacgt tcttttcgc
241 aacgggttgc cgcacagaac acagtgaag ctgcagggg ctcgcatctc tcctcaccg
301 gccgcccgcc ctacctgagg ccgcatcca cgcgggtga gtcgcttct gccgcctccc
361 gcctgtggtg cctcctgaac tgcgtccgcc gtctaggtaa gtttaaagct caggtcgaga
421 ccgggccttt gtccggcgtc ccttggagc ctacctagac tcagccggct ctccacgctt
481 tgcctgacct tcttgcctc actctacgtc ttgtttcgt tttctgtct gcgccgttac
541 agatccaagc tgtgaccggc gcctacgcta gatggtgagc aagggcgagg aggataacat
601 ggcatcacc aaggagtcca tgcgctcaa ggtgcacatg gagggtccg tgaacggcca
661 cgagttcag atcgagggag agggcgaggg ccgccctac gagggcaccc agaccgcaa
721 gctgaaggtg accaagggtg gcccctgcc ctgcctgg gacatcctgt ccctcagtt
781 catgtacggc tccaaggcct acgtgaagca ccccgcgac atcccgcact actgaagct
841 gtcctcccc gagggcttca agtgggagcg cgtgatgaac ttcgaggacg gcggcgtggt
901 gaccgtgacc caggactcct cctgcagga cggcgagtc atctacaagg tgaagctcg
961 cggcaccaac tcccctccg acggccccgt aatgcagaag aagaccatgg gctgggaggc
1021 ctctccgag cggatgtacc ccgaggacgg cgcctgaag ggcgagatca agcagaggct
1081 gaagctgaag gacggcgcc actacgacgc tgaggtcaag accacctaca aggccaagaa
1141 gcccgctcag ctgcccggcg cctacaacgt caacatcaag ttggacatca cctcccaca
1201 cgaggactac accatcgtgg aacagtacga acgcgccgag ggccgccact ccaccggcg

```

1261 catggacgag ctgtacaagt aatccgagct cggtagcaag cftaagtta aaccgctgat
 1321 cagccctcag tctgctctct agttgccagc catctgtgtt ttcccctcc cccgtgcctt
 1381 ccttgacctt ggaaggtgcc actcccactg tcttttcta ataaaatgag gaaattgcat
 1441 cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg
 1501 gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atgggggatc
 1561 cactagtctt agagcggccg ccaccgaggf ggagctccag cttttgtcc ctttagtgag
 1621 ggttaattgc gcgcttgccg taatcatggt catagctgtt tctgtgtga aattgttate
 1681 cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtcct
 1741 aatgagttag ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgtttc cagtgggaa 10
 1801 acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta
 1861 ttggcgctc ttcgcttcc tgcctcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc
 1921 gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttate cacagaatca ggggataacg
 1981 caggaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa aaggccgctg
 2041 tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa
 2101 gtcagagggt gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct
 2161 cctcgtcgc ctctcctgtt ccgacctgc cgtttaccgg atactgtcc gctttctcc
 2221 cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tgggtgtagg
 2281 tegtctcctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccagc cgtgcgctt
 2341 tatccgtaa ctatcgtctt gactccaacc cggtaagaca cgacttatc cactggcag 20
 2401 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gattcttga
 2461 agtggtgccc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctctga
 2521 agccagttac ctccgaaaa agagttgcta gctctgac cgcaaaaa accaccgctg
 2581 gtacgggtg ttttttgt tgcaagcagc agattacgc cagaaaaaa ggtatcaag
 2641 aagatcctt gatctttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaac tcacgttaag
 2701 ggattttgt catgagata tcaaaaagga tctcaccta gatccttta aaltaaaaat
 2761 gaagtttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaactg gctcagact taccaatgct
 2821 taatcagtga ggcacctate tcagcagatc gctatcttc tcatccata gttgcctgac
 2881 tccccgtct gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggccc agtgctgcaa
 2941 tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttate agcaataaac cagccagccg
 3001 gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa cttatccgc ctccatccag tctattaatt 30
 3061 gttgccggga agctagagta agtagtctc cagftaatag ttgcccgaac gttgttcca
 3121 ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggccttate agctccggtt
 3181 cccaacgate aaggcaggtt acatgatccc ccatgtgtg caaaaaagcg gttagctctt
 3241 tggctctcc gatcgtgtc agaagtaagt tggccgcatg gttatcactc atggttatgg
 3301 cagcactgca taattctct actgtcatgc catcagtaag atgctttct gtgactggtg
 3361 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tttgcccgg
 3421 cgtcaatagc ggataatacc gcgccacata gcagaactt aaaaagtctc atcattggaa
 3481 aacgttctc gggcgcaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcagatg
 3541 aaccactcg tgcaccaac tgatctcag catctttac ttcaccagc gtttctgggt
 3601 gagcaaaaa aggaaggcaa aatccgcaa aaaagggaa aaggcgaca cggaaatgtt
 3661 gaatactcat actcttctt ttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca 40

3721 tgagcggata catattgaa tgtattaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat
 3781 tccccgaaa agtgccacct aaattgtaag cgtaaatatt ttgtaaaaat tcgcgtaaa
 3841 tttttgtaa atcagctcat ttttaacca atagcccgaa atcggcaaaa tccctataa
 3901 atcaaaagaa tagaccgaga taggggtgag tgtgttcca gtttgaaca agagtccact
 3961 attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc
 4021 actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt tttgggtcgc aggtgccgta aagcactaaa
 4081 tcggaaccct aaagggagcc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc
 4141 gagaaaggaa ggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggg 10
 4201 cacgctgcgc gtaaccacca caccgcccgc gcttaatgeg ccgctacagg gcgcgtccca
 4261 ttcgccattc aggctgcgca actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct ctfcgctatt
 4321 acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccaggggt
 4381 ttccagtcga cgacgttga aaacgacggc cagtgcgcgc gcgtaatacg actcaactata
 4441 gggcgaattg ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggg atcgataagc ttgatatcgt
 4501 gtacaaaaaa gcaggcttta aaggaaccaa ttcagtcgac tggatccggg accaaggctg
 4561 ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc ctccatattt gcatatacga tacaaggctg
 4621 ttagagagat aattagaatt aattgactg taaacacaaa gatattagta caaaatcgt
 4681 gacgtagaaa gtaataattt ctgggtagt ttgcagttt aaaattatgt ttaaaatgg 20
 4741 actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt ctggcttta tatatctgt
 4801 ggaaaggacg aaacaccgtt taagagctat gctggaaca gcatagcaag ttaaataag
 4861 gctagtccgt tacaacttg aaaaagtggc accgagtcgg tgcttcattt gctgttccg
 4921 tggccgacac

【 0 1 7 2 】

【 表 1 4 】

pBluescript II SK+ U6- 547' 2-sgRNA(F+E) (配列番号 34).

LOCUS Exported 3388 bp ds-DNA circular 30
 DEFINITION synthetic circular DNA
 SOURCE synthetic DNA construct
 ORGANISM synthetic DNA construct
 REFERENCE 1 (bases 1 to 3388)
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..3388
 /organism="synthetic DNA construct"
 /mol_type="other DNA"
 rep_origin 13..453 40
 /direction=RIGHT
 /label=F1 ori
 CDS complement(460..528)
 /label=LacZ alpha
 primer_bind 599..616
 /label=M13-fwd
 primer_bind 626..645

```

        /label=T7
promoter    757..1019
        /label=U6 promoter
misc_feature 1020..1039
        /label=lambda2_guideRNA
misc_feature 1041..1132
        /label=sgRNA scaffold
primer_bind complement(1198..1217)
        /label=T3
primer_bind complement(1235..1255)
        /label=M13-rev
misc_binding complement(1261..1283)
        /label=LacO
promoter    complement(1288..1317)
        /label=lac
rep_origin  complement(1623..2251)
        /direction=LEFT
        /label=ColeE1 origin
CDS         complement(2403..3062)
        /label=AmpR
promoter    complement(3302..3330)
        /label=Amp prom

```

ORIGIN

```

1 ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgta aattttgtt aaatcagctc
61 atttttaac caataggccg aatcggcaa aatccctat aatcaaaag aatagaccga
121 gataggggtg agtgtgttc cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc
181 caactgcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc cactacgtg aaccatcacc
241 ctaatcaagt tttttgggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaaacc ctaaaggag
301 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa
361 agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac
421 cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcttc cattcgccat tcaggctgcg
481 caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc ctctcgtc ttagccagc tggcgaaagg
541 gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg tttcccagt cacgacgtt
601 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg
661 gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgatc gtgtacaaa aagcaggctt
721 taaaggaacc aatcagtcg actggatccg gtaccaaggc cgggcaggaa gagggcctat
781 tteccatgat tccitcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag ataattagaa
841 ttaattgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga aagtaataat
901 ttcttgggta gtttgcagt taaaattat gttttaaata ggactatcat atgcttaccg
961 taacttgaat gtaattcgat ttcttggctt tatatatctt gtgaaagga cgaaacaccg
1021 tgataagtgg aatgccatgg ttaagagct atgctggaaa cagcatagca agttaaata

```

1081 aggctagtcc gttatcaact tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtgctttt ttctgcagc
 1141 ccgggggagc cactagtctt agagcggccg ccaccgcggt ggagctccag cttttgtcc
 1201 ctttagtgag ggttaattgc gcgctfggcg taatcatggt catagctgtt tctgtgtga
 1261 aattgttacc cgtcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc
 1321 tgggggtgct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgcttc
 1381 cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc
 1441 ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttc tcgctcactg actcgtcgc ctcggtcgtt
 1501 cggctgcggc gagcgggtac agctcactca aaggcggtaa tacggttacc cacagaatca
 1561 ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa
 1621 aaggccgcgt tgetggcgtt ttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat
 1681 cgacgctcaa gtcagagggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
 1741 cctggaagct cctcgtcgc ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc
 1801 gcccttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt
 1861 tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagccgac
 1921 cgtcgcgctt taccggtaa ctatcgtctt gactccaacc cgtaagaca cgacttacc
 1981 ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca
 2041 gacttctga agtgggtggc taactacggc tactatagaa ggacagtatt tggatctgc
 2101 gctcgtcga agccagttac ctccgaaaa agagttgga gctctgac cggcaaaaa
 2161 accaccgctg gtacgggtgg tttttgtt tgcaagcagc agattacgc cagaaaaaa
 2221 ggatctcaa aagatcctt gatctttct acggggtcgc acgctcagtg gaacgaaac
 2281 tcaggttaag ggatttgggt catgagatta tcaaaaagga tctcaccta gatctttta
 2341 aattaaat gaagtttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacctg gctgacagt
 2401 taccaatgt taatcagta ggcacctacc tcagcgaict gtctatttcg ttatccata
 2461 gttgectgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc
 2521 agtgcgcaa tgataccgc agaccacgc tcaccggctc cagattacc agcaataaac
 2581 cagccagccg gaaggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa cttatccgc ctccatccag
 2641 tctattaatt gttccggga agctagagta agtagtccg cagttaatag ttgcgcaac
 2701 gttgtgcca ttgctacagg catcgtgggt tcacgctcgt cgtttggtat ggcctcattc
 2761 agtccgggtt cccaacgac aaggcgagt acatgatccc ccatgtgtg caaaaaagcg
 2821 gttagctcct tcggtcctcc gatcgtgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc
 2881 atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgctttct
 2941 gtgactggtg agtactcaac caagtcttc tgagaatagt gtatcggcg accgagttgc
 3001 tttgccccg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc
 3061 atcattggaa aacgttctc gggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc
 3121 agttcgatgt aaccactcgc tgcaccaac tgatctcag catctttac ttcaccagc
 3181 gttctgggt gagcaaaaa aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca
 3241 cggaaatgtt gaactcat actctcctt ttcaatatt attgaagcat ttatcagggt
 3301 tattgtcga tgagcggata catattgaa tgtattaga aaaataaaca aataggggtt
 3361 ccgcgacat ttccccgaaa agtgccac

【 0 1 7 3 】

【表 1 5】

EGFP λ⁺-サ-λ SaCas9 sgRNA (配列番号 47)

LOCUS Exported 4921 bp ds-DNA circular

DEFINITION synthetic circular DNA

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM recombinant plasmid

REFERENCE 1 (bases 1 to 4921)

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..4921

/organism="recombinant plasmid" 10

/mol_type="other DNA"

primer_bind 1..40

/label=EF1a_Gibson_F

primer_bind 1..20

/label=Primer 2

misc_feature 1..7

/label=sgRNA scaffold_termination

promoter 21..566

/label=EF1a promoter

primer_bind complement(554..591)

/label=EF1a_Gibson_R 20

CDS 572..1282

/codon_start=1

/product="monomeric derivative of DsRed fluorescent protein
(Shaner et al., 2004)"

/label=mCherry

/note="mammalian codon-optimized"

```

/translation="MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG
TQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNF
EDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK
GEIKQRLKCLKDGGHYDAEVKTTTYKAKKPVQLPGAYNVNIIKLDITSHNEDYTI VEQYERA
EGRHSTGGMDELYK"

```

30

primer_bind 572..591

/label=mCherry_BGH_F

primer_bind complement(1259..1306)

/label=Primer 1

primer_bind complement(1259..1286)

/label=mCherry_P2A_Gib_R

primer_bind complement(1259..1282)

/label=mCherry_HindIII_R

misc_feature 1283..1306 40

50

```

        /label=Gibson Overlap
primer_bind 1283..1301
        /label=mCherry_P2A_Gib_F
polyA_signal 1330..1554
        /label=bGH poly(A) signal
        /note="bovine growth hormone polyadenylation signal"
primer_bind complement(1535..1573)
        /label=mCherry_BGH_Gib_R
primer_bind complement(1535..1554)
        /label=mCherry_BGH_R
primer_bind complement(1536..1555)
        /label=bGH_NotI_R
primer_bind complement(1558..1573)
        /label=SK primer
        /note="common sequencing primer, one of multiple similar
        variants"
primer_bind complement(1608..1627)
        /label=T3
primer_bind complement(1645..1665)
        /label=M13-rev
misc_binding complement(1671..1693)
        /label=LacO
promoter complement(1698..1727)
        /label=lac
rep_origin complement(2033..2661)
        /direction=LEFT
        /label=ColE1 origin
CDS complement(2813..3472)
        /label=AmpR
promoter complement(3712..3740)
        /label=Amp prom
rep_origin 3811..4251
        /direction=RIGHT
        /label=F1 ori
CDS complement(4258..4326)
        /label=LacZ alpha
primer_bind 4397..4414
        /label=M13-fwd
primer_bind 4424..4443
        /label=T7
promoter 4555..4817

```

10

20

30

40

50


```

        /label=U6 promoter
primer_bind 4798..4843
        /label=NS_EGFP_SaCas9_F
primer_bind complement(4803..4817)
        /label=Primer 3
primer_bind complement(4803..4817)
        /label=extension_gibson_R
primer_bind 4804..4843
        /label=50bp_EGFP_SaCas9_F
misc_RNA 4819..4894
        /label=Sa gRNA scaffold
        /note="guide RNA scaffold for the Staphylococcus aureus
        CRISPR/Cas9 system"
primer_bind complement(join(4877..4921,1..20))
        /label=EGFP_SaCas9_RC_ex_R
primer_bind complement(join(4877..4921,1..20))
        /label=EGFP_SaCas9_ex_R
misc_feature 4895..4900
        /label=Linker
misc_feature 4901..4921
        /label=EGFP extension
primer_bind 4901..4921
        /label=RNA target with T7 Promoter Sequence (for IVT)

```

ORIGIN

```

1 ttttttct gcagccggg aaggatctgc gatcgtccg gtcgccgtca gtgggcagag
61 cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aacgggtgcc
121 tagagaaggt ggcgcggggg aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgcctttt
181 cccgaggggtg ggggagaacc gatatagaat gcagtagtgc cegtgaacgt tcttttcgc
241 aacgggtttg ccgccagaac acagtgaag cttegagggg ctgcatctc tcttcacgc
301 gcccgcgcc ctacctgagg ccgccatcca cgccggftga gtcgcttct gccgctccc
361 gcctgtggtg cctctgaac tgcgtccgcc gtctaggtaa gttfaagct caggtcgaga
421 ccgggccttt gtcggcgct ccttggagc ctacctagac tcagccggtc ctccacgctt
481 tgctgacc tgcttctca actctacgtc ttgtttctg ttctgttct gcgcccgtac
541 agatccaagc tgtgaccggc gcctacgcta gatggtgagc aaggcgagg aggataacat
601 ggccatcacc aaggagtcca tgcgctcaa ggtgcacatg gagggctccg tgaacggcca
661 cgagtccgag atcgagggcg agggcgaggg ccgcccctac gagggcacc agaccgcca
721 gctgaaggtg accaaggggtg gcccccctgc cttegctgg gacatcctgt cccctcagtt
781 catgtacggc tccaaggcct acgtgaagca ccccgcgac atccccgact actgaagct
841 gtcttcccc gagggcttca agtgggagcg cgtgatgaac ttcgaggacg gcggcgtggt
901 gaccgtgacc caggactcct cctgcagga cggcgagttc atctacaagg tgaagctgcg
961 cggcaccaac tcccctccg acggccccgt aatgcagaag aagaccatgg gctgggaggc

```

1021 ctctccgag cggatgtacc ccgaggacgg cgccctgaag ggcgagatca agcagaggct
 1081 gaagctgaag gacggcgccc actacgacgc tgaggtaag accacctaca aggccaagaa
 1141 gcccgtgcag ctgcccggcg cctacaacgt caacatcaag ttggacatca cctcccacia
 1201 cgaggactac accatcgtgg aacagtacga acgcgccgag ggccgcccact ccaccggcgg
 1261 catggacgag ctgtacaagt aatccgagct cggtagcaag ctaagtta aaccgctgat
 1321 cagcctcgac tgtgcttct agttgccagc catctgtgt ttgccctcc cccgtgcctt
 1381 cctfgacct ggaaggtgcc actcccactg tctttccta ataaatgag gaaattgcat
 1441 cgcattgtct gagtagtgt cattctatc tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg
 1501 gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atgggggatc 10
 1561 cactagtct agagcggcgg ccaccgctgt ggagctccag ctttgttcc ctttagtgag
 1621 ggttaattgc gcgctggcg taatcatggt catagctgtt tctgtgtga aattgtatc
 1681 cgctcaaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtcct
 1741 aatgagtgag ctaactaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgcttc cagtcgggaa
 1801 acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggg ggtttgcgta
 1861 ttgggcgctc tccgcttcc tcgctcactg actcgtcgc ctcggtcgtt cggctcgggc
 1921 gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttacc cacagaatca ggggataacg
 1981 caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa aaggccgctg
 2041 tgctggcgtt ttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa
 2101 gtcagaggtg gcgaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct
 2161 cctcgtcgc ctctcctgt cggacctgc cgttaccgg ataccttcc gccttctcc 20
 2221 cttcgggag cgtggcgtt tctcatagct cagctgtag gtatctcagt tcggtgtagg
 2281 tegtctcgc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccagc cgctcgcct
 2341 tatccgtaa ctatcgtctt gactcaacc cggtaagaca cacttatcg cactggcag
 2401 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gattcttga
 2461 agtggggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctgc gctctgctga
 2521 agccagttac ctccgaaaa agagtggta gctctgac cggcaaaaa accaccgctg
 2581 gtacgggtgg ttttttgt tgcaagcagc agattacgc cagaaaaaa ggatctcaag
 2641 aagatcttt gatctttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag
 2701 ggatttggc catgagatta tcaaaaagga tctcaccta gatcttita aattaaaaat
 2761 gaagtttaa atcaatctaa agtataatg agtaaacctg gtctgacagt taccaatgct 30
 2821 taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttc tcatccata gttgcctgac
 2881 tccccgtct gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtctgcaa
 2941 tgataccgag agaccacgc tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagcgg
 3001 gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa cttatccgc ctccatccag tctattaatt
 3061 gttgccggga agctagagta agtagttgc cagtaatag ttgcgcaac gttgttcca
 3121 ttgtacagg catcgtggg tcacgctctg cgtttggtat ggettcattc agctccggtt
 3181 cccaacgac aaggcgagtt acatgatccc ccatgtgtg caaaaaagcg gtagctct
 3241 tcggtcctcc gatcgtgtc agaagtaagt tggccgagc gttatcactc atggttatgg
 3301 cagcactgca taattctct actgtcatg caccgtaag atgctttct gtgactgggtg
 3361 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatcggcgc accgagttgc tctgccccg
 3421 cgtcaatagc ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattgaa 40

3481 aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt
 3541 aaccactcgc tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac ttcaccagc gtttctgggt
 3601 gagcaaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggggcgaca cggaaatggt
 3661 gaatactcat actcttctt ttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca
 3721 tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat
 3781 tccccgaaa agtgccacct aaattgtaag cgftaatatt ttgttaaaat tcgcgttaa
 3841 ttttggtaa atcagctcat ttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa tccttataa
 3901 atcaaaagaa tagaccgaga taggggtgag tgttgttcca gtttggaca agagtccact 10
 3961 attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc
 4021 actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt tttgggtcgc aggtgccgta aagcactaaa
 4081 tcggaaccct aaaggagacc cccgatttag agcttgacgg ggaagccgg cgaacgtggc
 4141 gagaaaggaa gggaaagaaag cgaaggagc gggcgctagg gcgctggca gtgtagcgg
 4201 cacgctgcgc gtaaccacca caccgcccgc gctaatgcg ccgctacagg gcgctcca
 4261 ttcgccattc aggctgcgca actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct ctctctatt
 4321 acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cggcagggt
 4381 tcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgagcgc gcgtaatacg actcactata
 4441 gggcgaattg ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggg atcgataagc ttgatatcgt 20
 4501 gtacaaaaa gcaggcttta aaggaacca ttcagtcgac tggatccggt accaaggtcg
 4561 ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc ctctatatt gcataacga tacaaggctg
 4621 ttagagagat aattagaatt aattgactg taaacacaaa gatattagta caaaatacgt
 4681 gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagttt aaaattatgt ttaaaatgg
 4741 actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta tatactttgt
 4801 ggaaaggacg aaacaccggt tatagtactc tggaacaga atctactata acaaggcaaa
 4861 atgccgtgtt tatctcgtca acttgttggc gagattcatt gtgtcggcca cggaacaggc
 4921 a

30

【 0 1 7 4 】

【 表 1 6 】

ADAR2 E488Q dSaCas9 pCDNA3 1 (配列番号 48)

LOCUS Exported 9842 bp ds-DNA circular

DEFINITION synthetic circular DNA

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM recombinant plasmid

REFERENCE 1 (bases 1 to 9842)

FEATURES Location/Qualifiers 40

source 1..9842

/organism="recombinant plasmid"

/mol_type="other DNA"

primer_bind complement(213..234)

/label=pCDNA3_CMV_out_R

enhancer 235..614

/label=CMV enhancer

50

```

        /note="human cytomegalovirus immediate early enhancer"
promoter    615..818
        /label=CMV promoter
        /note="human cytomegalovirus (CMV) immediate early
promoter    863..881
        /label=T7 promoter
        /note="promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase"
primer_bind 927..985
        /label=HI-ADAR-XTEN_F
misc_feature 927..954
        /label=Homology 1_pCDNA3.1
CDS         961..2100
        /codon_start=1
        /label=ADARB1(E488Q)_Catalytic Domain

/translation="MLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAVVMTTGTQDVKDA
KVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTOLELYLNNKDDQKRSI
FQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRRKARGQLRTKI
ESGQGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFS
SIIILGSLYHGDHLSRAMYQRI SNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNW
TVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVP SHLLRSKITKPNVYHES
KLAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQFSLTP"
primer_bind 961..982
        /label=Primer 4
primer_bind 1111..1138
        /label=Primer 1
primer_bind 1440..1478
        /label=E488Q_Mutagenesis_F
primer_bind complement(1440..1478)
        /label=E488Q_Mutagenesis_R
primer_bind complement(2080..2112)
        /label=ADAR2DD_GS_R
primer_bind complement(2080..2100)
        /label=Primer 5
primer_bind 2086..2132
        /label=SaCas9_Gib_F
misc_feature 2101..2112
        /label=GS_linker
misc_feature 2113..5268
        /label=dSaCas9(D10A,N580A)

```

primer_bind complement(5245..5268)
 /label=SaCas9_Gib_R
 primer_bind 5249..5289
 /label=SaCas9_HA_F
 primer_bind 5269..5290
 /label=ADAR2_CD_Inverse_F
 CDS 5272..5298
 /codon_start=1
 /product="HA (human influenza hemagglutinin) epitope tag" 10
 /label=HA
 /translation="YPYDVPDYA"
 primer_bind complement(5290..5312)
 /label=AXC_NLSout_NESin_R
 primer_bind complement(5290..5310)
 /label=NLS_out_R
 CDS 5317..5337
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T
 antigen" 20
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"
 CDS 5344..5364
 /codon_start=1
 /product="nuclear localization signal of SV40 large T
 antigen"
 /label=SV40 NLS
 /translation="PKKKRKV"
 primer_bind complement(5349..5408)
 /label=XTEN-Cas9-H2_R
 primer_bind complement(5349..5393) 30
 /label=Primer 7
 primer_bind 5363..5387
 /label=NLS_out_NES_full_F
 primer_bind 5365..5387
 /label=AXC_NLSout_NESin_F
 misc_feature 5374..5408
 /label=Homology 2_pCDNA3.1
 primer_bind 5374..5392
 /label=pCDNA3_CMV_out_F
 primer_bind 5395..5418 40
 /label=bGH_HindIII_F

polyA_signal 5442..5666
 /label=bGH poly(A) signal
 /note="bovine growth hormone polyadenylation signal"
 primer_bind complement(5648..5666)
 /label=bGH_NotI_R
 rep_origin 5712..6140
 /direction=RIGHT
 /label=f1 ori
 /note="f1 bacteriophage origin of replication; arrow
 indicates direction of (+) strand synthesis" 10
 promoter 6154..6483
 /label=SV40 promoter
 /note="SV40 enhancer and early promoter"
 rep_origin 6334..6469
 /label=SV40 ori
 /note="SV40 origin of replication"
 CDS 6550..7344
 /codon_start=1
 /gene="aph(3')-II (or nptII)"
 /product="aminoglycoside phosphotransferase from Tn5" 20
 /label=NeoR/KanR
 /note="confers resistance to neomycin, kanamycin, and G418
 (Geneticin(R))"

 /translation="MIEQDGLHAGSPAAWVERLFGYDWAQQQTIGCSDAAVFRLSAQGRP
 VLFVKTDLSGALNELQDEAARLSWLATTGVPCA AVL DVVTEAGRDWLLLGEVPGD LLS
 SHLAPA EKVSIMADAMRRLHTLDPATCFD HQAKHRIERARTRMEAGLVDQDDLDEEHQ
 GLAPAE L FARL KARP DGEDLVVTHGDA CLPNIMVENGRFSGFIDCGRLGVADRYQDIA
 LATRDIAEELGGEWADRFLVLYGIAAPDSQRIAFYRLLDEFF"
 polyA_signal 7518..7639 30
 /label=SV40 poly(A) signal
 /note="SV40 polyadenylation signal"
 primer_bind complement(7688..7704)
 /label=M13 rev
 /note="common sequencing primer, one of multiple similar
 variants"
 protein_bind 7712..7728
 /label=lac operator
 /bound_moiety="lac repressor encoded by lacI"
 /note="The lac repressor binds to the lac operator to
 inhibit transcription in E. coli. This inhibition can be 40

```

relieved by adding lactose or
isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)."
promoter    complement(7736..7766)
            /label=lac promoter
            /note="promoter for the E. coli lac operon"
protein_bind 7781..7802
            /label=CAP binding site
            /bound_moiety="E. coli catabolite activator protein"
            /note="CAP binding activates transcription in the presence
of cAMP."
rep_origin   complement(8090..8675)
            /direction=LEFT
            /label=ori
            /note="high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of
replication"
CDS          complement(8846..9706)
            /codon_start=1
            /gene="bla"
            /product="beta-lactamase"
            /label=AmpR
            /note="confers resistance to ampicillin, carbenicillin, and
related antibiotics"

```

```

/translation="MSIQHFRVALI PFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYI
ELDLNSGKILESFRPEERFPMMSDFKVLCCGAVLSRIDAGQEQLGRRRIHYSQNDLVEYS
PVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTITIGGPKELTAFLEHNMGDHSVTRLDRW
EPPELNEAIPNDRDRTTTPVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSA
LPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGAS
LIKHW"

```

```

promoter    complement(9707..9811)
            /gene="bla"
            /label=AmpR promoter

```

ORIGIN

```

1  gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg
61  ccgcatagtt aagccgatg ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg
121 cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc
181 ttagggtag gcgctttcgc ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt
241 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata
301 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc
361 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc
421 attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt

```

481 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt
541 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca
601 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaatca tgggctgga tagcggtttg
661 actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagttg ttttggcacc
721 aaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg
781 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca
841 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc
901 gtttaaacgg gccctctaga ctgagcggc cgccactgtg ctggatatct gcagagaacc
961 atgfttagctg acgctgtctc acgctggtc ctggtaagt ttggtgacct gaccgacaac 10
1021 ttctctccc ctacgctcg cagaaaagt ctggctggag tctcatgac aacaggcaca
1081 gatgttaag atgccaaggt gataagtgt tctacaggaa caaatgtat taatggtgaa
1141 tacatgagt atcgtggcct tgcattaat gactgcatg cagaaataat atctcggaga
1201 tcttctca gattctta tacacaact gagctttact taaatacaa agatgatcaa
1261 aaaagatcca tcttcagaa atcagagcga ggggggtta ggctgaagga gaatgtccag
1321 ttcatctgt acatcagcac ctctccctgt ggagatgcca gaatctctc accacatgag
1381 ccaatctcg aagaaccagc agatagacac ccaaatcgt aagcaagagg acagctacgg
1441 accaaaatg agtctggtca ggggacgatt ccagtgcct ccaatgcgag catccaacg
1501 tgggacgggg tctgcaagg ggagcggctg ctacatgt cctgcagtga caagattgca
1561 cgctggaacg tgggtggcat ccagggatcc ctgctcagca tttctgga gccctttac
1621 ttctcagca tcatctggg cagcctttac cacggggacc accttccag ggccatgac 20
1681 cagcggatct ccaacataga ggacctgcca cctcttaca cctcaacaa gcctttgctc
1741 agtggcatca gcaatgcaga agcagggcag ccagggaagg ccccaactt cagtgtcaac
1801 tggacggtag gcgactccgc tattgaggtc atcaacgcca cgactgggaa ggatgagctg
1861 ggccgcgct cccgcctgtg taagcacgcg ttgtactgtc gctggatgag tctgacggc
1921 aaggttccct ccaacttact acgtccaag attaccaagc ccaactgtga ccatgagtc
1981 aagctggcgg caaaggagta ccaggccgcc aaggcgcgtc ttttcacagc ctctcaacg
2041 gcgggctggt gggcctgggt ggagaagccc accgagcagg accagtctc actcacgccc
2101 ggatccgat ccaagcggaa ctacatctg ggctggcca tggcatcac cagcgtgggc
2161 tacggcatca tgcactcga gacacgggac gtgatcgtg ccggcgtgag gctgttcaaa
2221 gaggccaacg tggaaaacaa cgagggcagg cggagcaaga gaggcggcag aaggctgaag 30
2281 cggcggaggc ggcataaat ccagagagtg aagaagctgc ttttcgacta caacctgctg
2341 accgaccaca gcgagctgag cggcatcaac ccctacgagg ccagagtga gggcctgagc
2401 cagaagctga gcgaggaaga gttcttccc gccctgctg acctggccaa gagaagaggc
2461 gtgcacaacg tgaacgaggt ggaagaggac accggcaacg agctgtccac caaagagcag
2521 atcagccgga acagcaaggc cctggaagag aaatagctgg ccgaactgca gctggaacgg
2581 ctgaagaaag acggcgaagt gcggggcagc atcaacagat tcaagaccag cgactacgtg
2641 aaagaagcca aacagctgct gaaggtgagc aaggcctacc accagctgga ccagagctt
2701 atcgacacct acatgacct gctggaacc cggcggacct actatgaggg acctggcag
2761 ggcagcccct tggctggaa ggacatcaa gaatggtacg agatgctgat gggccactgc
2821 acctactcc ccgaggaact gcggagcgtg aagtacgctt acaacgccga cctgtacaac
2881 gccctgaacg acctgaacaa tctcgtgatc accagggacg agaacgagaa gctggaatat 40

2941 tacgagaagt tccagatcat cgagaacgtg ttcaagcaga agaagaagcc caccctgaag
 3001 cagatcgcca aagaatcct cgtgaacgaa gaggatatta agggctacag agtgaccagc
 3061 accggcaagc ccgagttcac caacctgaag gtgtaccacg acatcaagga cattaccgcc
 3121 cggaaagaga ttattgagaa cgcggagctg ctggatcaga ttgccaagat cctgaccate
 3181 taccagagca gcgaggacat ccaggaagaa ctgaccaatc tgaactccga gctgaccag
 3241 gaagagatcg agcagatctc taatctgaag ggctataccg gcaccacaa cctgagcctg
 3301 aaggccatca acctgatcct ggacgagctg tggcacacca acgacaacca gatcgtatc
 3361 ttcaaccggc tgaagctggt gcccaagaag gtggacctgt cccagcagaa agagatcccc
 3421 accacctgg tggacgactt catctgagc cccgtcgtga agagaagctt catccagagc 10
 3481 atcaaagtga tcaacgcat catcaagaag tacggcctgc ccaacgacat cattatcgag
 3541 ctggcccgcg agaagaactc caaggacgcc cagaaaatga tcaacgagat gcagaagcgg
 3601 aaccggcaga ccaacgagcg gatcgaggaa atcatccgga ccaccggcaa agagaacgcc
 3661 aagtacctga tcgagaagat caagctgcac gacatgcagg aaggcaagtg cctgtacagc
 3721 ctggaagcca tcctctgga agatctgctg aacaacctt tcaactatga ggtggaccac
 3781 atcatcccca gaagcgtgic ctctgacaac agcttcaaca acaaggtgct cgtgaagcag
 3841 gaagaagcca gcaagaaggg caaccggacc ccattccagt acctgagcag cagcgacagc
 3901 aagatcagct acgaaacct caagaagcac atcctgaatc tggccaaggg caagggcaga
 3961 atcagcaaga ccaagaaaga gtatctgctg gaagaacggg acatcaacag gttctccgtg
 4021 cagaagact tcatcaaccg gaacctggtg gataccagat acgccaccag aggcctgatg
 4081 aacctgctgc ggagctactt cagagtgaac aacctggacg tgaagtga gtcctcaat 20
 4141 ggcgcttca ccagcttctt gcggcggag tggaaagttt agaaagagcg gaacaagggg
 4201 tacaagcacc acgcccagga cgccctgac attgccaacg ccgatttcat ctcaaagag
 4261 tggagaanaa tggacaagc caaaaaagt atggaaaacc agatgttca ggaaaagcag
 4321 gccgagagca tgcccagat cgaaaccgag caggagtaca aagagatctt catcaccacc
 4381 caccagatca agcacattaa ggacttcaag gactacaagt acagccaccg ggtggacaag
 4441 aagcctaata gagagctgat taacgacacc ctgtactcca cccggaagga cgacaagggc
 4501 aacacctga tcgtgaacaa tctgaacggc ctgtacgaca aggacaatga caagctgaaa
 4561 aagctgatca acaagagccc cgaaaagctg ctgatgtacc accacgacc ccagacctac
 4621 cagaactga agctgattat ggaacagtac ggcgacgaga agaatcccc gtacaagtac
 4681 tacgaggaag ccgggaacta cctgaccaag tactccaaa aggacaacgg ccccgtgatc 30
 4741 aagaagatta agtattacgg caacaaactg aacgcccac tggacatcac cgacgactac
 4801 cccaacagca gaaacaaggt cgtgaagctg tcctgaagc cctacagatt cgacgtgtac
 4861 ctggacaatg gcgtgtacaa gttcgtgacc gtgaagaatc tggatgtgat caaaaaagaa
 4921 aactactacg aagtgaatag caagtctat gaggaagcta agaagctgaa gaagatcagc
 4981 aaccagggcg agttatcgc ctcttctac aacaacgatc tgatcaagat caacggcgag
 5041 ctgtatagag tgatggcgt gaacaacgac ctgctgaacc ggatcgaagt gaacatgatc
 5101 gacatcacct accgagagta cctggaaaac atgaacgaca agaggccccc caggatcatt
 5161 aagacaatcg cctccaagac ccagagcatt aagaagtaca gcacagacat tctgggcaac
 5221 ctgtatgaag tgaatctaa gaagcaccct cagatcatca aaaagggcgc ctatccctat
 5281 gacgtgcccg attatgccag cctgggcagc ggctcccca agaaaaacg caaggtggaa
 5341 gatcctaaga aaaagcggaa agtggacgtg taaccaccac actggactag tggatccgag 40

5401 ctcggtacca agcttaagtt taaaccgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagtgcc
5461 gccatctgtt gttgcccct cccccgtcc ttcttgacc ctggaagggt ccactccac
5521 tgccttcc taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat
5581 tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca
5641 tgctggggat gcggtgggct ctatggctc tgaggcggaa agaaccagct ggggctctag
5701 ggggtatccc cacgcgccct gtacggcgc altaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg
5761 cagcgtgacc gctacactg ccagcgcct agcgcgccct ccttctgctt tcttccctc
5821 cttctcgcc acgttcgccc gcttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg
5881 gttccgattt agtctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggtc 10
5941 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt tttcgcct ttgacgttgg agtccacgt
6001 ctttaatagt ggactctgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctatct
6061 ttttgattta taagggattt tgccgattc ggctattgg ttaaaaaatg agctgattta
6121 acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtg aatgtgtgc agttagggtg tggaaagtcc
6181 ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg
6241 tgtgaaaagt cccaggctc ccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag
6301 teagcaacca tagtcccgc ctaactcgc ccatccgc ccctaactcc gccagttcc
6361 gccattctc cgccccatg ctgactaatt tttttatt atgcagaggc cgaggccgc
6421 tctgcctcg agctatcca gaagtatga ggaggcttt ttggaggcct aggctttgc
6481 aaaaagctcc cgggagctg tatatccatt ttcggatctg atcaagagac aggatgagga
6541 tctttcga tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctcggccgc tgggtggag 20
6601 aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcgct gctctgatgc cgccgtctc
6661 cggctctag cgcagggcg cccggtctt ttgtcaaga ccgacctgc cgggtccctg
6721 aatgaactgc aggacaggc agcgcggcta tctggctgg ccacgacggg cgttcttgc
6781 gcagctgtc tcgactgtg cactgaagcg ggaaggact ggctctatt gggcgaagt
6841 ccggggcagg atctctgtc atctacctt gctctgccc agaaagtatc catcatggct
6901 gatcaatgc ggggctgca tacgctgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg
6961 aaacatcga tcgagcagc acgtactcg atggaagccg gcttctgca tcaggatgat
7021 ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tccagcgt caaggcgcg
7081 atgcccagc gcgaggatct cgtctgacc catggcagtg cctgcttgc gaatacatg
7141 gtgaaaatg gccctttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccg 30
7201 tatcaggaca tagcgttgc taccctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct
7261 gaccgttcc tctgtctta cggatcgcc gctccgatt cgcagcgc atcctctat
7321 cgcttcttg acgagttct ctgagcggga ctctggggt cgaatgacc gaccaagcga
7381 cgccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgcc cttctatgaa aggttggct
7441 tcggaatcgt ttccgggac gccggctgga tgatctcca gcgcggggat ctcatgctg
7501 agttctcgc ccaccaaac ttgttattg cagctataa tggttacaaa taaagcaata
7561 gcatcacaaa ttacaaaat aaagcattt ttactgca tttagttgt gtttgc
7621 aactcaata tttatctat catgtctga taccctgac ctctagctag agcttggcgt
7681 aatcatggtc atagctgtt cctgtgtgaa attgtatcc gctcaaat ccacacaaca
7741 tacgagccg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactecat
7801 taattcgtt gcgctactg cccgcttcc agtcgggaaa cctgtctgc cagctgcatt 40

7861 aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gttgcgtat tgggcgctct tccgcttct
 7921 cgctactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatca gctactcaa
 7981 aggcggaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa
 8041 aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt tccatagge
 8101 tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtagg cgaaccgca
 8161 caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctctgttc
 8221 cgaccctgcc gttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt
 8281 ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 10
 8341 gtgtgcaega accccccgtt cageccgacc gctgcgctt atccggtaac tatcgtctg
 8401 agtccaacce ggtaagacac gactatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta
 8461 gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttctttaa gtggtggcct aactacggct
 8521 acactagaag aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa
 8581 gagttgtag ctctgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtttt tttgttga
 8641 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tctttgatc tttctacgg
 8701 ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gtaagggat tttggtcatg agattatcaa
 8761 aaaggatctt cacctagatc ctttaaat aaaaatgaag tttaaatca atctaaagta
 8821 tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaac cagtgaggca cctatctcag 20
 8881 cgatctgtct attctgtca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga
 8941 tacgggaggg ctaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac
 9001 cggtccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggct
 9061 ctgcaacttt atccgctcc atccagteta ttaattgtg ccgggaagct agagtaagta
 9121 gttccagct taatagttg cgcaacgtt ttgccattgc tacaggcacc gtggtgtcac
 9181 gctcgtcgtt tggatggct tcaatcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat
 9241 gatccccat gttgtgcaaa aaagcggta gctcctcgg tctccgac gttgtcagaa
 9301 gtaagtggc cgcagtgtta tcaatcaggt ttatggcagc actgcataat tctctactg
 9361 tcatgccacc cgtaaagatgc tttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcaatctgag 30
 9421 aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gccggcgctc aatacgggat aataccgcgc
 9481 cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct
 9541 caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat
 9601 ctcagcacc ttttacttcc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg
 9661 ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcttttc
 9721 aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttgaatgta
 9781 ttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg
 9841 tc

【 0 1 7 5 】 40

【 表 1 7 】

LCV2 puro CFTR 51 1217 キ'ﾌ'ﾝ (配列番号 35)

LOCUS Exported 14250 bp ds-DNA circular

DEFINITION synthetic circular DNA

KEYWORDS LCV2_puro_CFTR_51_1217_gibson

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM recombinant plasmid
REFERENCE 1 (bases 1 to 14250)
FEATURES Location/Qualifiers

source	1..14250	
	/organism="recombinant plasmid"	
	/mol_type="other DNA"	
misc_feature	1..33	
	/note="NLS"	
misc_feature	34..57	10
	/note="FLAG"	
misc_feature	58..123	
	/note="P2A"	
CDS	124..720	
	/note="Puro"	
misc_binding	736..1324	
	/note="WPRE"	
misc_feature	736..755	
	/note="mCherry_PCR_tail"	
LTR	1395..1630	20
	/note="3' LTR"	
rep_origin	4079..4304	
	/note="ColE1"	
misc_feature	4516..5322	
	/note="AmpR"	
LTR	6472..6660	
	/note="5' LTR (R and U5 portions; U3 was replaced by the CMV promoter)"	
misc_feature	6711..6848	
	/note="Psi"	
misc_feature	6768..6771	30
	/note="SD; splice donor"	
misc_feature	6815..7179	
	/note="gag"	
misc_feature	7325..7566	
	/note="RRE"	
misc_feature	8084..8201	
	/note="CPPT; central polypurine tract"	
promoter	8252..8500	
	/note="Human U6"	
misc_feature	8522..8607	40
	/note="sgRNA scaffold"	

misc_feature 8608..8613
 /note="Linker"

promoter 8665..8920
 /note="EFS-NS"

CDS 8944..10083
 /codon_start=1
 /note="ADARB1_Catalytic Domain" (SEQ ID NO: 36)
 /translation="MLADAVSRLVLGKFGDLTDFSSPHARRKVLAVVMTTGTDVKDAKV
 ISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQ
 KSERGGFRLKENVQFHL YISTSPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRKARGQLRTKIES
 GQG TIVRSNASIQ TW DGV LQGERLLTMS CSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSII
 LGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWT
 VGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVP SHLLRSKITKPNVYH
 ESKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPT EQDQFSLTP" 10

misc_feature 8944..8946
 /note="hSpCas9"

CDS 10084..10131
 /codon_start=1
 /note="XTEN"
 /translation="SGSETPGTSESATPES" (SEQ ID NO: 37) 20

CDS 10132..14235
 /codon_start=1
 /product="catalytically dead mutant of the Cas9
 endonuclease from the Streptococcus pyogenes Type II
 CRISPR/Cas system"
 /note="dCas9"
 /note="RNA-guided DNA-binding protein that lacks
 endonuclease activity due to the D10A mutation in the RuvC
 catalytic domain and the H840A mutation in the HNH
 catalytic domain" (SEQ ID NO: 38) 30

/translation="MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYK VPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG
 ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDD SFFHRLEESFLV
 EEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFR
 GHFLIEGDLNPDNSVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL E
 NLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLDNLLA
 QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGA SQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRE
 DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA
 RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSL
 LYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYF
 KKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDR 40

EMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD
 GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV
 VDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILKEHP
 VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVEDAIVPQSFLKDDSIDNKV
 LTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGELSELD
 KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
 QFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVVYDVRKMIKSE
 QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR
 KVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAY
 SVLVVAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLP
 KYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQK
 QLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANL DKVLSAYNKHRDKPIREQAENIHLFT
 LTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD"

10

ORIGIN (SEQ ID NO: 35)

1 acaaagaagg ctggacagcc taagaagaag aaagattaca aagacgatga cgataagggg
 61 tccggcgcaa caaacttctc tctgctgaaa caagccggag atgtcgaaga gaatcctgga
 121 cggaccgagt acaagcccaac ggtgcgcctc gccaccgcgc acgacgtccc cagggcgcta
 181 cgcaccctcg ccgccgcgtt cggcgactac cccgccacgc gccacaccgt cgatccggac
 241 cggcacatcg agcgggtcac cgagctgcaa gaactcttc tcacgcgcgt cgggctcgac
 301 atcggcaagg tctgggtcgc ggacgacggc gccgcgggtg cggtctggac cagccgggag
 361 agcgtcgaag cggggcggtt gttcggcgag atcggcccgc gcatggccga gttgagcggg
 421 tcccggctcg ccgcgcagca acagatggaa ggcctcctgg cgccgcaccg gcccaaggag
 481 cccgcgtggt tctggccac cgtcggagtc tcgcccgacc accagggcaa gggctctggc
 541 agcgcctcgc tctccccgg agtggaggcg gccgagcgcg cgggggtgcc cgccttctg
 601 gagacctcgc cgcgccgcaa cctccccctc tacgagcggc tcggcttcac cgtcaccgcc
 661 gacgtcgagg tgcccgaagg accgcgcacc tgggtcatga cccgcaagcc cggtgcctga
 721 acgcgttaag tcgacaatca acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt
 781 cttaactatg ttgctcttt tacgctatgt ggatacgtg cttaaatgcc tttgtatcat
 841 gctattgctt cccgtatggc ttcatcttc tectcttctg ataatcctg gttgctgtct
 901 ctttatgagg agttgtggcc cgttgcagg caacgtggcg tgggtgcac tgtgtttgct
 961 gacgcaacce ccaactggtg gggcattgcc accacctgic agctccttc cgggacttcc
 1021 gctttcccc tccctattgc cagggcgaa ctcacgcgc cctgccttgc ccgctgctgg
 1081 acaggggctc ggctgtggg cactgacaat tccgtggtg tctcggggaa atcatcgtcc
 1141 tttcctggc tctcgcctg tttgccacc tggattctgc ggggacgic cttctgctac
 1201 gtccctcgg cctcaatcc agcggacctt cttcccgcg gectgetgccc gctctgccc
 1261 cctctccgc gtcttcgct tcgcccctag acgagtcgga tctcccttg ggccgcctcc
 1321 ccgcgtcgac ttaagacca atgactaca aggcagctgt agatcttagc cacttttaa
 1381 aagaaaagg gggactggaa gggctaatic actccaacg aagacaagat ctgcttttg
 1441 cttgtactgg gtctctctg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctt ggctaactag
 1501 ggaaccact gcttaagcct caataaagct tgccttgagt gctcaagta gtgtgtgcc

20

30

40

1561 gtctgtgtg tgactctggt aactagagat cctcagacc ctittagtca gtgtggaaaa
1621 tctctagcag ggcccgttta aacccgctga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag
1681 ccactgttg ttgcccctc ccccgtcct tcctgacce tggaaagtgc cactcccact
1741 gtccttctct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc tgagtaggtg tcattctatt
1801 ctgggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt gggaaagaca tagcaggcat
1861 gctggggatg cgggtgggctc tatggcttct gaggcggaaa gaaccagctg gggctctagg
1921 gggatcccc acgcgccctg tagcggcgca ttaagcggcg cgggtgtggt ggttacgcgc
1981 agcgtgaccg ctacactgc cagcgccta gcgccgctc ctctcctt ctccctcc
2041 ttctcgcca cgttcgccgg ctctcccgt caagctctaa atcgggggct cccttaggg 10
2101 ttccgattta gtgctttac gcacctgac ccaaaaaac ttgattaggg tgatggtca
2161 cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt ttccgctt tgacgttggg gtccacgtc
2221 ttaaatagtg gactctgtt ccaaactgga acaactca accctatctc ggtctattct
2281 ttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaatga gctgattaa
2341 caaaaatta acgcgaatta attctgtgga atgtgttca gttagggtgt ggaaagtccc
2401 caggctcccc agcaggcaga agtatgcaa gcatgcatct caattagtca gcaaccaggf
2461 gtggaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt
2521 cagcaacct agtcccgcc ctaactccg ccatcccgc ctaactccg cccagtccg
2581 cccattctcc gcccatggc tgactaatt ttttattta tgcagaggcc gagggccct
2641 ctgccttga gctattccag aagtagtgag gaggctttt tggaggccta ggcttttga
2701 aaaagctccc gggagcttgt atatcattt tcggatctga tcagcacgtg ttgacaatta 20
2761 atcatcgca tagtatatc gcatagtata atacgacaag gtgaggaact aaacctggc
2821 caagtgacc agtgccgtc cgtgtctac cgcgcgcac gtcgccggag cggtcgagtt
2881 ctggaccgac cggctcgggt tctcccggga ctctgtggag gacgacttcg cgggtgtggt
2941 cgggagcag gtgacctgt tcacagcgc ggtccaggac cagggtgtgc cggacaacac
3001 cctggcctgg gtgtgggtgc gggcctgga cgagctgtac gccgagtgtt cggaggtcgt
3061 gtccacgaac ttccgggacg cctccgggcc ggccatgacc gagatcggcg agcagccgtg
3121 ggggcgggag ttcccccgc gcgaccggc cggcaactgc gtgcacttcg tggccgagga
3181 gcaggactga cacgtctac gagatttoga ttccaccgc gccttctatg aaaggttggg
3241 ctccggaatc gtttccggg acgccggctg gatgatctc cagcggggg atctcatgct
3301 ggagttctc gccaccacca acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa 30
3361 tagcatcaca aattcacaataaaagcatt ttttactg cattctagt gtggttgtc
3421 caaactcacc aatgtatctt atcatgtctg tataccgtcg acctctagct agagcttggc
3481 gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgtat ccgctcaca ttccacaca
3541 catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgc taatgagtga gtaactcac
3601 attaattgcg ttgcgctcac tgcggcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca
3661 ttaatgaatc ggccaacgc cggggagagg cggtttgcgt atgggcgct ctccgctc
3721 ctgcctcact gactcgtgc gctcggctgt tggctcgg cgagcggfat cagctcactc
3781 aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc
3841 aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag
3901 gctccgccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaacc
3961 gacaggacta taaagatacc aggcgttcc cctggaagc tcctcgtc gctctcgtg 40

4021 tccgacctg cgcctaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct
 4081 ttccatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgftcgcct ccaagctggg
 4141 ctgtgtgcaac gaacccccg ttcagccccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct
 4201 tgagtccaac ccggtgaagac acgacttacc gccactggca gcagccactg gtaacaggat
 4261 tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtcttg aagtgggtggc ctaactacgg
 4321 ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagfta ccttcggaaa
 4381 aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcgggtg gttttttgt
 4441 ttgcaagcag cagattaccg gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc
 4501 tacggggctc gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagftaa gggattttgg tcatgagatt 10
 4561 atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaa tgaagttta aatcaatcta
 4621 aagtatatat gagtaaacct ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat
 4681 ctacgcgac tgctctttc gttcatccat agttgcctga ctccccgctg ttagataaac
 4741 tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtctgca atgataccgc gagaccacg
 4801 ctaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggcgg agcgcagaag
 4861 tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttccggg aagctagagt
 4921 aagtagttcg ccagtaata gtttgcgcaa cgttggcc attgctacag gcacgtggt
 4981 gtcacgctcg tcttttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcagat
 5041 tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtctc cgatcgtgt
 5101 cagaagtaag ttggccgagc tgttactact catggttatg gcagcactgc ataattctt
 5161 tactgtcatg ccacccgtaa gatgctttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt 20
 5221 ctgagaatag tgatgcccg gaccgagttg ctctgcccg gcgtcaatac gggataatac
 5281 cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa
 5341 acttcaagg atctaccgc tgttagatc cagttcgatg taaccactc gtgcaccaa
 5401 ctgatctca gcactttta ctccaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca
 5461 aaatgccga aaaaaggga taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttct
 5521 tttcaatat tattgaagca ttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatattga
 5581 atgtattag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca ttccccgaa aagtgccacc
 5641 tgacgtgac ggtcgggag atctcccgat ccctatggt gcactctcag tacaatctgc
 5701 tctgatccg catagttaa ccagtatctg ctccctgctt gtgtgttga ggtcgtgag
 5761 tagtgcgca gcaaaattha agctacaaca aggcaaggct tgaccgaca ttgcatgaa 30
 5821 aatctgctta gggtagggc ttttgcgctg ctcccgatg tacgggcccag atatacgcgt
 5881 tgacattgat tattgactg ttattaatag taatcaatta cggggctcatt agttcatagc
 5941 ccatafatgg agttccgctg tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc
 6001 aacgacccc gcccaatgac gtcaataatg acgtatgtt ccatagtaac gccaataggg
 6061 actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgccactt ggcagtacat
 6121 caagtgtatc atatgccaag tacgcccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgc
 6181 tggcattatg cccagtatc gacctatgg gactttccta ctggcagta catctacgta
 6241 ttatgcatcg ctattaccat ggtgatgagg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag
 6301 cggttgact cacggggatt tccaagtctc cacccactg acgtcaatgg gagttgttt
 6361 tggcaccaaa atcaacggga ctttcaaaaa tctcgttaaca actccgccc attgacgcaa
 6421 atggcggta ggcgtgtacg gttggaggtc tataaagca gcgcgtttg cctgtactgg 40

6481 gtctctctgg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact
 6541 gcttaagcct caataaagct tcctttagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgtgtg
 6601 tgactctggt aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcag
 6661 tggcgcccga acagggactt gaaagcgaaa gggaaaccag aggagctctc tcgacgcagg
 6721 actcggtctg ctgaagcgcg cacggcaaga ggcgaggggc ggcgactggt gactacgcca
 6781 aaaatttga ctgacggagg ctagaaggag agagatgggt gcgagagcgt cagtattaag
 6841 cgggggagaa ttagatcgcg atgggaaaaa atcggttaa ggccaggggg aaagaaaaa
 6901 tataaattaa aacatatagt atgggcaagc agggagctag aacgattcgc agttaatcct
 6961 ggctgttag aacatcaga aggctgtaga caaatactgg gacagctaca accatccct 10
 7021 gagacaggat cagaagaact tagatcatta tataatacag tagcaaccct ctattgtgtg
 7081 catcaagga tagagataaa agacaccaag gaagcttag acaagataga ggaagagcaa
 7141 acaaaaagta agaccaccgc acagcaagcg gccgctgac ttacagactg gaggaggaga
 7201 tatgagggac aattggagaa gtgaattata taaatataaa gtagtaaaaa ttgaaccatt
 7261 aggagtagca cccaccaagg caaagagaag agtgggtgcag agagaaaaa gagcagtggg
 7321 aataggagct ttgtcctg ggttcttggg agcagcagga agcactatgg gcgcagcgtc
 7381 aatgacgctg acggtacagg ccagacaatt attgtctggt atagtgcagc agcagaacia
 7441 tttgctgagg gctattgagg cgcaacagca tctgttgcaa ctcacagtct ggggcatcaa
 7501 gcagctccag gcaagaatcc tgctgtgga aagataccta aaggatcaac agctcctggg
 7561 gatttggggt tgctctggaa aactcattg caccactgct gtccttggga atgctagtgtg
 7621 gagnaataaa tctctggaac agatttggaa tcacacgacc tggatggagt gggacagaga 20
 7681 aattaacaat tacacaagct taatacactc ctaattgaa gaatcgcaa accagcaaga
 7741 aaagaatgaa caagaattat tggaaataga taaatgggca agtttggga attggttaa
 7801 catacaaat tggctgtggt atataaaatt atcataatg atagtaggag gcttggtagg
 7861 ttaagaata gttttgctg tactttctat agtgaataga gtaggcagg galattcacc
 7921 attatcgtt cagaccacc tccaacccc gaggggaccc gacaggcccc aaggaataga
 7981 agaagaaggt ggagagagag acagagacag atccatcga ttagtgaacg gatcggcact
 8041 gcgtgcgcca attctgcaga caaatggcag tattatcca caattttaa agaaaagggg
 8101 ggattggggg gtacagtgca ggggaaagaa tagtagacat aatagcaaca gacatacaa
 8161 ctaagaatt acaaaaaca attacaaaaa tcaaaatt tcgggtttat tacagggaca
 8221 gcagagatcc agtttggta attaaggtag cgagggccta ttcccatga ttcctcata 30
 8281 ittgcatata cgatacaagg ctgttagaga gataattaga attaattga ctgtaaacac
 8341 aaagatatta gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa ttcttgggt agtttgcagt
 8401 tttaaaatta tgttttaaa tggactatca tatgcttacc gtaactgaa agtattcga
 8461 tttcttgct ttatatatct tgtgaaagg acgaaacacc gttcataggg atccaagttt
 8521 tgttaagag ctatgctgga aacagcatag caagttaa taaggctagt ccgttatcaa
 8581 cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgctc attttctc cactgttga aagttttt
 8641 cctgcagccc gggaattcgc tagctaggtc ttgaaaggag tgggaattgg ctccggtgcc
 8701 cgtcagtggg cagagcgcac atgcccaca gtcccagaga agttgggggg aggggtcggc
 8761 aattgatccg gtccttagag aaggtggcgc ggggtaact gggaaagtga tctcgtgtac
 8821 tggctccgc ittttccga ggggtgggga gaaccgtata taagtgcagt agtcgccgtg
 8881 aacgttctt ttcgaacgg gtttccgcc agaacacagg accggttcta gagcgtgcc 40

8941 accatgttag ctgacgctgt ctcacgcctg gtcctgggta agtttgggta cctgaccgac
9001 aacttctect ccctcacgc tcgcagaaaa gtgctggctg gagtcgtcat gacaacaggc
9061 acagatgta aagatgcaa ggtgataagt gtttctacag gaacaaatg tattaatggt
9121 gaatacatga gtgatcgtgg ccttgcatia aatgactgcc atgcagaaat aatatctcgg
9181 agatccttgc tcagatttt ttatacacia ctigagcttt acttaaataa caaagatgat
9241 caaaaaagat ccatcttca gaaatcagag cgagggggggt ttaggctgaa ggagaatgtc
9301 cagtttcatc tgtacatcag cacctctccc tgtggagatg ccagaatctt ctcaccat
9361 gagccaatcc tggagaacc agcagataga cacccaaate gtaaagcaag aggacagcta
9421 cggacaaaa tagagtctgg tcaggggacg attccagtgc gctccaatgc gagcatcaa 10
9481 acgtgggacg ggggtctgca aggggagcgg ctgctacca tgtctgcag tgacaagatt
9541 gcacgctgga acgtggtggg catccaggga tccctgctca gcattttcgt ggagccatt
9601 tacttctega gcatcctct gggcagcctt taccacgggg accaccttc caggccatg
9661 taccagcga tctcaacat agaggacctg ccacctctt acacctcaa caagccttg
9721 ctcagtggca tcagcaatgc agaagcacgg cagccaggga aggccccaa cttcagtgc
9781 aactggacgg taggcgactc cgctattgag gtcatcaacg ccacgactgg gaaggatgag
9841 ctgggccgcg cgtcccctgt gtgaagcac gcgttgact gtcgctggat gcgtgtcac
9901 ggcaaggttc cctcccactt actacgctcc aagattacca agcccaactg gtaccatgag
9961 tccaagtctg cggcaaagga gtaccaggcc gccaaaggcg gtctgttca agccttcatc
10021 aaggcggggc tggggcctg ggtggagaag cccaccgagc aggaccagt ctcactcag
10081 cccagtggaa gtgagacacc gggaaacctca gagagcgcca cggcagaaag catggacaag 20
10141 aagtacaga tcggcctggc catcggcacc aactctgtg gctgggctg gatcaccgac
10201 gagtacaagg tgccccagaa gaaattcaag gtgctgggca acaccgaccg gcacagcatc
10261 aagaagaacc tgatcggcgc cctgctgttc gacagcggag aaacagccga ggccaccgg
10321 ctgaagagaa cggcagaag aagatacacc agacggaaga accggatctg ctatctgaa
10381 gagatctca gcaacgagat ggccaagggt gacgacagct tctccacag actggaagag
10441 tcttctctgg tggaaagga taagaagcac gagcggcacc ccatctcgg caacatcgtg
10501 gacgaggtgg cctaccacga gaagtaccc accatctacc acctgagaaa gaaactggtg
10561 gacagcaccg acaaggcga cctgcggtg atctatctgg cctggccca catgatcaag
10621 tccggggcc acttctctgat cgaggcgac ctgaacccc acaacagcga cgtggacaag
10681 ctgttcatcc agctggtgca gacctaac cagctgttc aggaaaacc catcaacgcc 30
10741 agcggcgtgg acgccaaggc catctgtct gccagactga gcaagagcag acggctggaa
10801 aatctgatcg cccagctgcc cggcgagaag aagaatggcc tgttggcaa cctgattgcc
10861 ctgagcctgg gcctgacccc caactcaag agcaactcg acctggcga ggtatccaaa
10921 ctgcagctga gcaaggacac ctacgacgac gacctggaca acctgctggc ccagatcggc
10981 gaccagtacg ccgacctgtt tctggccgc aagaacctgt ccgacgcat cctgctgagc
11041 gacatcctga gagtgaacg cgagatcacc aaggccccc tgagcgcctc tatgatcaag
11101 agatacgacg agcaccacca ggacctgacc ctgctgaaag ctctcgtgcg gcagcagctg
11161 cctgagaagt acaaagagat tttctcgac cagagcaaga acggctacgc cggctacatc
11221 gatggcggag ccagccagga agagtctac aagtctca agcccatcct ggaaaagatg
11281 gacggcaccg aggaactgct cgtgaagctg aacagagagg acctgctgcg gaagcagcgg
11341 acctcgaca acggcagcat ccccaccag atccacctgg gagagctgca cgcattctg 40

11401 cggcggcagg aagatttta cccattcctg aaggacaacc gggaaaagat cgagaagatc
 11461 ctgaccttcc gcatccccta ctacgtgggc cctctggcca ggggaaacag cagattcgcc
 11521 tggatgacca gaaagagcga gaaaccatc accccttga acttcgagga agtgggtggac
 11581 aaggcgcca gcgccagag ctcacagag cggatgacca acttcgataa gaacctgccc
 11641 aacgagaagg tgctgcccga gcacagcctg ctgtacgagt acttcacctg gtacaacgag
 11701 ctgaccaaaag tgaatacgt gaccgagggg atgagaaaag ccgcttctct gagcggcgag
 11761 cagaaaaaag ccatcgttga cctgctgttc aagaccaacc ggaagtgtac cgtgaagcag
 11821 ctgaaagagg actacttcaa gaaaatcgag tgcttcgact ccgtggaaat ctccggcgtg
 11881 gaagatcggg tcaacgcctc cctgggcaca taccagatc tgctgaaaat tatcaaggac 10
 11941 aaggacttcc tggacaatga gaaaacgag gacattctgg aagatatcgt gctgacctg
 12001 aactgtttg aggacagaga gatgatcgag gaacggctga aaacctatgc ccacctgtt
 12061 gacgaaaag tgatgaagca gctgaagcgg cggagataca ccggctgggg caggctgagc
 12121 cggaaagtga tcaacggcat ccgggacaag cagtccggca agacaatct ggatttctg
 12181 aagtccgacg gcttcgcca cagaaactt atgcagctga tccacgacga cagcctgacc
 12241 ttaaagagg acatcagaa agcccagggt tccggccagg gcgatagcct gcacgagcac
 12301 attgccaatc tggccggcag ccccgccatt aagaaggcca tcttcgagac agtgaagggtg
 12361 gtggacgagc tcgtgaaagt gatgggccgg cacaagcccg agaacatcgt gatcgaatg
 12421 gccagagaga accagaccac ccagaaggga cagaagaaca gccgagagag aatgaagcgg
 12481 atcgaagagg gcatcaaga gctgggcagc cagatcctga aagaacacc cgtgaaaaac
 12541 acccagctgc agaacgagaa gctgtacctg tactacctgc agaatgggcg ggatatgtac 20
 12601 gtggaccagg aactggacat caaccggctg tccgactacg atgtggacgc tatcgtcct
 12661 cagagcttcc tgaaggacga ctccatcgt acaaaagtgc tgactcggag cgacaagaac
 12721 cggggcaaga gcgacaactg gccctccgaa gaggtcgtga agaagatgaa gaactactgg
 12781 cggcagctgc tgaatgcaa gctgattacc cagaggaagt tcgacaatct gaccaaggcc
 12841 gagagaggcg gcctgagcga actggataag gccggcttca tcaagagaca gctggtggaa
 12901 acccggcaga tcacaaagca cgtggcacag atcctggact cccggatgaa cactaagtac
 12961 gacgagaacg acaactgat ccgggaagtg aaagtatca cctgaagtc caagctggtg
 13021 tccgatttcc ggaaggattt ccagttttac aaagtgcgag agatcaaaa ctaccaccac
 13081 gcccacgacg cctacctgaa cgccgtcgtg ggaaccgccc tgatcaaaa gtacctaaag
 13141 ctgaaagcg agttcgtgta cggcgactac aagggtgtac acgtcggaa gatgatcgcc 30
 13201 aagagcgagc aggaatcgg caaggctacc gccaaagtact tctctacag caacatcatg
 13261 aacttttca agaccgagat taccctggcc aacggcgaga tccggaagcg gcctctgatc
 13321 gagacaaacg gcgaaacagg cgagatcgtg tgggataagg gccgggactt tgccacctg
 13381 cggaaagtgc tgtctatgcc ccaagtgaat atcgtgaaaa agaccgaggt gcagacagggc
 13441 ggcttcagca aagagtctat cctgcccag aggaacagcg acaagctgat cgcagaaaag
 13501 aaggactggg accctaagaa gtacggcggc ttcgacagcc ccacctggc ctattctgtg
 13561 ctggtgtggtg ccaaagtggg aaaggccaag tccaagaaac tgaagagtgt gaaagagctg
 13621 ctgggatca ccatcatgga aagaagcagc ttcgagaaga atccatcga ctttctggaa
 13681 gccaaaggct acaagaagt gaaaaaggac ctgatcatca agctgcctaa gtactcctg
 13741 ttcgagctgg aaaacggccg gaagagaatg ctggcctctg ccggcgaact gcagaaggga
 13801 aacgaactgg ccctgcctc caaatatgtg aacttctgt acctggccag ccatatgag 40

13861 aagctgaagg gctccccga ggataatgag cagaaacagc tgtttgtgga acagcaciaa
 13921 cactacctgg acgagatcat cgagcagatc agcgagttct ccaagagagt gatcctggcc
 13981 gacgctaate tggacaaggt gctgagcggc tacaacaagc acagagaaa gcctatcaga
 14041 gagcagggcg agaataatc cactgttt accctgacca atctgggagc cctgcccgc
 14101 ttaagtact ttgacaccac catcgaccgg aagaggtaca ccagcaccaa agaggtgctg
 14161 gacgccacc tgatccacca gagcatcacc ggcctgtacg agacacggat cgacctgtct
 14221 cagctgggag gcgacaagcg acctgcccgc 50

【 0 1 7 6 】

【表 1 8 】

AXCM LCV2 puro IDUA No-spacer gibson (配列番号 39)

LOCUS Exported 14230 bp ds-DNA circular

DEFINITION synthetic circular DNA

KEYWORDS AXCM_LCV2_puro_IDUA_No-spacer_gibson

SOURCE synthetic DNA construct

ORGANISM synthetic DNA construct

REFERENCE 1 (bases 1 to 14230)

10

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..14230

/organism="synthetic DNA construct"

/mol_type="other DNA"

LTR 828..1016

/note="5' LTR (R and U5 portions; U3 was replaced by the
CMV promoter)"

misc_feature 1067..1204

/note="Psi"

20

misc_feature 1124..1127

/note="SD; splice donor"

misc_feature 1171..1535

/note="gag"

misc_feature 1681..1922

/note="RRE"

misc_feature 2440..2557

/note="CPPT; central polypurine tract"

promoter 2608..2856

/note="Human U6"

30

misc_feature 2857..2942

/note="sgRNA scaffold"

misc_feature 2943..2948

/note="Linker"

promoter 3001..3256

/note="EFS-NS"

40

50

CDS 3280..4419
 /codon_start=1
 /note="ADARBI_Catalytic Domain" (SEQ ID NO: 40)
 /translation="MLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAVVMTTGTDVKDAKV
 ISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQ
 KSERGGFRLKENVQFHLIYSTPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPPNRKARGQLRDKIES
 GQGTIPVRSNASIQTWGVLQGERLLTMSKSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSII
 LGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPILLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWT
 VGDSAIEVINAATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVPShLLRSKITKPNVYH
 ESKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPTAQDQFSLTP" 10

misc_feature 3280..3282
 /note="hSpCas9"

CDS 4420..4467
 /codon_start=1
 /note="XTEN"
 /translation="SGSETPGTSESATPES" (SEQ ID NO: 41)

CDS 4468..8571
 /codon_start=1
 /product="catalytically dead mutant of the Cas9
 endonuclease from the Streptococcus pyogenes Type II
 CRISPR/Cas system" 20
 /note="dCas9"
 /note="RNA-guided DNA-binding protein that lacks
 endonuclease activity due to the D10A mutation in the RuvC
 catalytic domain and the H840A mutation in the HNH
 catalytic domain" (SEQ ID NO: 42)

/translation="MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIG
 ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSDFFHRLEESFLV
 EEDKKHERHPHIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTKADLRLIYLALAHMIKFR
 GHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL
 NLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA
 QIGDQYADLFLAAKNLSAAILLSDILRVNTEITKAPLSAMIKRYDEHHQDLTLLKAL
 VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNRE
 DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYVVGPLA
 RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSL
 LYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYF
 KKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDR
 EMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLLINGIRDKQSGKTILDFLKSD
 GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV
 VDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIKELGSQILKEHP" 40

VENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKV
 LTRSDKNRKGSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGGLSELD
 KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
 QFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSE
 QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR
 KVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAY
 SVLVVAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLP
 KYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQK
 QLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIHLFT
 LTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD"

10

misc_feature 8572..8619

/note="NLS"

CDS 8572

/codon_start=1

/product="catalytically dead mutant of the Cas9
 endonuclease from the Streptococcus pyogenes Type II
 CRISPR/Cas system"

/note="dCas9"

/note="RNA-guided DNA-binding protein that lacks
 endonuclease activity due to the D10A mutation in the RuvC
 catalytic domain and the H840A mutation in the HNH
 catalytic domain"

20

/translation=""

misc_feature 8620..8643

/note="FLAG"

misc_feature 8644..8709

/note="P2A"

CDS 8710..9306

/note="Puro"

misc_binding 9322..9910

/note="WPRE"

30

LTR 9981..10216

/note="3' LTR"

rep_origin 12665..12890

/note="ColE1"

misc_feature 13102..13908

/note="AmpR"

ORIGIN (SEQ ID NO: 39)

1 gtcgacggat cgggagatct cccgatcccc tatggtgcac tetcagtaca atctgctctg

61 atgccgcata gitaagccag tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggtc gctgagtagt

40

50

121 gcgcgagcaa aatitaagct acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc atgaagaatc
 181 tgcttagggt taggcgtttt gcgctgcttc gcgatgtacg ggccagatat acgcgttgac
 241 attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat
 301 atatggagtt ccgcgittaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccacg
 361 acccccgccc attgacgtca afaatgacgt atgttccat agtaacgcca atagggactt
 421 tccattgacg tcaatgggtg gagtattac ggtaactgc cacttgga gfacatcaag
 481 tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc
 541 attatgccc gfacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag
 601 tcategctat taccatgggt atgcggtttt ggcagtacat caatgggctt ggatagcggg 10
 661 ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgtttggc
 721 accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaacte cgccccattg acgcaaatgg
 781 gcggtaggcy tgtacggtgg gaggtctata taagcagcgc gtttgcctg tactgggtct
 841 ctctggtag accagatctg agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt
 901 aagcctcaat aaagcttgc ttgagtgtt caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac
 961 tctgtaact agagatccct cagaccctt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc
 1021 gcccgaacag ggacttga gcaaaaggga aaccagagga gctctctga cgcaggactc
 1081 ggcttctga agcgcgcacg gcaagaggcg agggcgccg actggtgagt acgcaaaaa
 1141 tttgactag cggaggctag aaggagagag atgggtgcy gagcgtcagt attaagcggg
 1201 ggagaattag atcgcgatgg gaaaaaattc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaataa 20
 1261 aataaaaaca tatagtatgg gcaagcaggg agctagaacg atcgcagt aatcctggc
 1321 tgttagaac atcagaaggc ttagacaaa tactgggaca gtfacaacca tccctcaga
 1381 caggatcaga agaacttaga tcattatata atacagtagc aacctctat tgtgtgcatc
 1441 aaaggataga gataaaagac accaaggaag cttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca
 1501 aaagtaagac caccgcacag caagcggccg ctgatctca gacctggagg aggagatag
 1561 agggacaatt ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaattga accattagga
 1621 gtagcaccca ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaagagc agtgggaata
 1681 ggagctttgt tcttgggtt ctgggagca gcaggaagca ctatgggcy agcgtcaatg
 1741 acgctgacgg tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaattg
 1801 ctgagggcta ttgaggcga acagcatctg ttgcaactca cagtctggg catcaagcag
 1861 cccaggcaaat gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt 30
 1921 tggggtgct ctgaaaact cattgacac actgctgcy ctggaatgc tagttggagt
 1981 aataaatctc tggacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaatt
 2041 aacaattaca caagctaat acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag
 2101 aatgaacaag aatattgga attagataaa tgggcaagt tttggaattg gtttaacata
 2161 acaattggc tttggtatat aaaattatc ataagatag taggaggctt gtaggttta
 2221 agaatagtt ttctgtact ttctatagt aatagagta ggcaaggata ttcaccatta
 2281 tctttcaga cccacctcc accccagg ggaccgaca ggcccgaagg aatagaagaa
 2341 gaaggtggag agagagacag agacagatcc atcgattag tgaacggatc ggcactgctt
 2401 gcgccaattc tgcagacaaa tggcagtatt catccacaat tttaaaagaa aaggggggat
 2461 tgggggtac agtgcagggg aaagaatagt agacataata gcaacagaca tacaactaa
 2521 agaattacaa aaacaatta caaaaattca aaatttcgg gttattaca gggacagcag 40

2581 agatccagtt tggtaatta aggtaccgag ggcctatttc ccatgattcc tcatattg
 2641 catatacga acaaggctgt tagagagata attagaatta attgactgt aaacacaaag
 2701 atattagtagt aaaatacgtg acgtagaaaag taataatttc ttgggtagt tgcagttta
 2761 aaattatgt ttaaaatgga ctatcatatg cttaccgtaa ctgaaaagta ttccgatttc
 2821 ttggctttat atactttgtg gaaaggacga aacaccgttt aagagctatg ctgaaacag
 2881 catagcaagt taaataaagg ctagtccgtt atcaactga aaaagtggca ccgagtcggt
 2941 gcttcattac ttcggcccag agctgctcct tttttcctg cagcccggga attcgttagc
 3001 taggtcttga aaggagtggg aattggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg
 3061 cccacagtc ccgagaagt ggggggaggg gtcggcaatt gatccggtgc ctagagaagg 10
 3121 tggcgcgggg taaactggga aagtgatgct gtgtactggc tccgccttt tcccagggg
 3181 gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg tcttttctg caacgggttt
 3241 gccccagaa cacaggaccg gttctagagc gctgccacca tgtagctga cgtgtctca
 3301 cgctgttcc tgggtaagt ttgtgacctg accgacaact tctctcccc taccgctcgc
 3361 agaaaagtgc tggctggagt cgtcatgaca acaggcacag atgttaaaga tgccaaggtg
 3421 ataagtgtt ctacaggaac aaaatgtatt aatggatga acatgagtga tctgtgctt
 3481 gcattaatg actgcatgc agaaataata tctcggagat cctgtctag atttctttat
 3541 acacaactg agcttactt aaataacaaa gatgatcaaa aaagatccat cttcagaaa
 3601 tcagagcgag gggggtttag gctgaaggag aatgtccagt tcatctgta catcagcacc
 3661 tctcctgtg gagatgccag aatcttctca ccacatgagc caatcctgga agaaccagca
 3721 gatagacacc caaatcgtaa agcaagagga cagctacgga ccaaataaga gtctgttagc 20
 3781 gggacgattc cagtgcctc caatgcgagc atccaacgt gggacggggg gctgcaaggg
 3841 gagcgctgc tcaccatgc ctgcatgac aagattgcac gctggaacgt ggtgggcatc
 3901 caggatccc tctcagcat tttctggag cccatttact tctcagcat catctgggc
 3961 agcctttacc acggggacca ctttccagg gccatgtacc agcggatctc caacatagag
 4021 gacctgccac ctctctacac cctcaacaag ctttctca gtggcatcag caatgcagaa
 4081 gcacggcagc caggaaggc cccaacttc agtctcaact ggacggtagg cgactccgct
 4141 attgaggtca tcaacgccac gactgggaag gatgagctgg gccgcgctc ccgctgtgt
 4201 aagcacgctg tctactgtc ctggatgctg gtcacggca aggtccctc cacttacta
 4261 cgtccaaga ttaccaagcc caactgtac catgagtcca agctggcggc aaaggagtac
 4321 caggcccca aggcgctgtc ttccacagcc tcatcaagg cgggctggg ggctgggtg 30
 4381 gagaagccca ccgagcagga ccagtttca ctacgccca gtggaagtga gacaccggga
 4441 acctcagaga gcgccacgcc agaaagcatg gacaagaagt acagcatcg cctggccatc
 4501 ggcaccaact ctgtgggctg ggccgtgac accgacgagt acaaggtgcc cagcaagaaa
 4561 tcaaggtgc tgggcaaac cgaccggcac agcatcaaga agaacctgat cggcgcctg
 4621 ctgtcagaca gcggagaaac agccgaggcc acccgctga agagaaccgc cagaagaaga
 4681 tacaccagac ggaagaaccg gatctgctat ctgcaagaga tctcagcaa cgagatggc
 4741 aaggtggacg acagcttct ccacagactg gaagagtct tctgttggga agaggataag
 4801 aagcagagc ggcacccat cttcggcaac atcgtggacg aggtggccta ccacgagaag
 4861 taccaccca tctaccact gagaagaaa ctggtggaca gcaccgaca ggccgacctg
 4921 cggctgatct atctggcct ggcccacatg atcaagtcc gggccactt cctgatcag
 4981 ggcgacctga accccgacaa cagcagctg gacaagctgt tcatccagct ggtgcagacc 40

5041 tacaaccagc tgttcgagga aaaccccatc aacgccagcg gcgtggacgc caaggccatc
 5101 ctgtctgcc a gactgagcaa gagcagacgg ctggaaaatc tgatcgccca gctgcccggc
 5161 gagaagaaga atggcctgtt cggcaacctg attgccctga gcctgggctt gaccccaac
 5221 ttcaagagca acttcgacct ggccgaggat gccaaactgc agctgagcaa ggacacctac
 5281 gagcagcacc tggacaacct gctggcccag atcggcgacc agtacgccga cctgtttctg
 5341 gccccaaga acctgtccga cggcatcctg ctgagcgaca tcttgagagt gaacaccgag
 5401 atcaccaagg cccccctgag cgctctatg atcaagagat acgacgagca ccaccaggac
 5461 ctgacctgc tgaagctct cgtgcggcag cagctgcctg agaagtaca agagatttc
 5521 ttcgaccaga gcaagaacgg ctacgccggc tacatgatg gcggagccag ccaggaagag 10
 5581 ttctacaagt tcatcaagcc cactctggaa aagatggacg gcaccgagga actgctcgtg
 5641 aagctgaaca gagaggacct gctgcggaag cagcggacct tgcacaacgg cagcatcccc
 5701 caccagatcc acctgggaga gctgcacgcc attctgcggc ggcaggaaga ttttacca
 5761 ttcctgaagg acaaccggga aaagatcgag aagatctga cttccgcat ccctactac
 5821 gtgggcccct tggccagggg aaacagcaga ttcgctgga tgaccagaaa gagcggaggaa
 5881 accatcccc cctggaactt cgaggaaagt gtggacaagg gcgccagcgc ccagagcttc
 5941 atcgagcggg tgaccaactt cgataagaac ctgcccaacg agaaggtgct gcccaagcac
 6001 agcctgctgt acgagtactt caccgtgtac aacgagctga ccaagtga atactgacc
 6061 gagggaatga gaaagcccgc cttctgagc ggcgagcaga aaaaagccat cgtggacctg
 6121 ctgtcaaga ccaaccggaa agtgaccgtg aagcagctga aagaggacta cttcaagaaa
 6181 atcgagtgtc tgcactcctt ggaaatctcc ggcgtggaag atcgggtcaa cgctccctg 20
 6241 ggcacatacc acgatctgct gaaaattatc aaggacaagg acttctgga caatgaggaa
 6301 aacgaggaca ttctggaaga tatcgtgctg accctgacac tgtttgagga cagagagatg
 6361 atcgaggaac ggctgaaaac ctatgccac ctgttcgacg acaaagtgat gaagcagctg
 6421 aagcggcggg gatacaccgg ctggggcagg ctgagccgga agctgatcaa cggcatccgg
 6481 gacaagcagt ccggcaagac aatcctggat ttctgaagt ccgacggctt cgccaacaga
 6541 aacttcatgc agctgatcca cgacgacagc ctgacctta aagaggacat ccagaaagcc
 6601 caggtgtccg gccagggcga tagcctgcac gagcacatg ccaatctggc cggcagcccc
 6661 gccattaaga agggcatcct gcagacagtg aaggtggtgg acgagctcgt gaaagtgat
 6721 ggccggcaca agcccagaaa catcgtgatc gaaatggcca gagagaacca gaccaccag
 6781 aaggagcaga agaacagccg cgagagaatg aagcggatcg aagagggcat caaagagctg 30
 6841 ggcagccaga tctgaaaga acaccccgtg gaaaacacc agctgcagaa cgagaagctg
 6901 tactgtact acctgcagaa tgggcgggat atgtactgag accaggaact ggacatcaac
 6961 cggctgtccg actacgatgt ggacgctatc gtcctcaga gctttctgaa ggacgactcc
 7021 atcgataaca aagtctgac tcggagcgc aagaaccggg gcaagagcga caactgccc
 7081 tccgaagagg tctgaaaga gatgaagaac tactggcgc agctgctgaa tgccaagctg
 7141 attaccaga ggaagtctga caatctgacc aaggccgaga gagcggcctt gagcgaactg
 7201 gataaggccc gcttcatca gagacagctg gtggaaacct ggcagatcac aaagcacgtg
 7261 gcacagatcc tggactccc gatgaacact aagtagcagc agaacgaca actgatccgg
 7321 gaagtgaag tgatcacct gaagtccaag ctggtgtccg atttccgaa ggatttccag
 7381 ttttacaag tgcgagat caacaactac caccacgcc acgacgcta cctgaacgc
 7441 gtcgtgggaa ccgccctgat caaaaagtac cctaagctgg aaagcgagtt cgtgtacggc 40

7501 gactacaagg tgtacgacgt gcggaagatg atcgccaaga gcgagcagga aatcggcaag
7561 gctaccgcca agtacttctt ctacagcaac atcatgaact ttttcaagac cgagattacc
7621 ctggccaacg gcgagatccg gaagcggcct ctgatcgaga caaacggcga aacaggcgag
7681 atcgtgtggg ataagggccg ggactttgcc accgtgcgga aagtgtctgc tatgcccac
7741 gtgaatatcg tgaaaaagac cgaggtgcag acaggcggct tcagcaaaga gtctatcctg
7801 cccaagagga acagcgacaa gctgatcgcc agaagaagg actgggacc taagaagtac
7861 ggcggtctcg acagcccccac cgtggcctat tctgtctgg tggggccaa agtggaag
7921 ggcaagtcca agaaactgaa gagtgtgaaa gagctgtctgg ggatcaccat catggaaaag
7981 agcagctfcg agaagaatcc catcgacttt ctggaagcca agggctacaa agaagtgaaa 10
8041 aaggacctga tcatcaagct gcctaagtac tccctgttcg agctggaaaa cggccggaag
8101 agaatgtctg cctctgccgg cgaactgcag aagggaacg aactggcctt gccctccaaa
8161 tatgtgaact tectgtacct ggccagccac tatgagaagc tgaagggtc ccccgaggat
8221 aatgagcaga aacagctgtt tgtggaacag cacaaacact acctggacga gatcatcgag
8281 cagatcagcg agttctcaa gagagtgatc ctggccgacg ctaatctgga caaggtgtctg
8341 agcgctaca acaagcacag agacaagcct atcagagagc aggccgagaa tatcatccac
8401 ctgtttacc tgaccaatct gggagccct gccgcctca agtacttga caccaccatc
8461 gaccggaaga ggtacaccag caccaagag gtgctggacg ccacctgat ccaccagagc
8521 atcaccggcc tftacgagac acggatcgac ctgtctcagc tgggagcga caagcgacct
8581 gccccacaa agaaggctgg acaggctaa aagaagaag attacaaaga cgtgacgat
8641 aagggatccg gcgcaacaaa cttctctctg ctgaaacaag ccggagatgt cgaagagaat 20
8701 cctggaccga ccgagtacaa gcccacggtg cgctcgcga cccgcgacga cgtcccagg
8761 gccgtacgca cctcgcgcg cgcgttcgcc gactacccc ccacgcgca caccgtgat
8821 ccggaccgcc acatcgagcg ggtcaccgag ctgcaagaac tcttctcac gcgcgtcggg
8881 ctcgacatcg gcaaggtgtg ggtcgcggac gacggcggc cgggtggcgg ctggaccagc
8941 ccggagagcg tcgaagcggg ggcggtgttc gccgagatcg gcccgcgat ggccgagttg
9001 agcggttccc ggctggccc gcagcaacag atggaaggcc tctggcgc gcaccggccc
9061 aaggagcccc cgtggttctt ggccaccgtc ggagtctgc cggaccacca gggcaagggt
9121 ctgggacgcg ccgtctgtct ccccggagtg gaggcggccg agcgcgcccg ggtgcccgc
9181 tctctggaga cctcgcgcc ccgcaacct ccttctacg agcggctcgg cttcaccgt
9241 acccccagc tcgaggtgcc cgaaggaccg cgcacctggt gcatgaccgg caagcccgtt 30
9301 gcctgaacgc gtaagtcca caatcaacct ctggattaca aaattgtga aagattgact
9361 ggtattctta actatgttc tcttttacg ctatgtggat acgtgtctt aatgcctttg
9421 tatcatgeta ttgctcccg tatggctttc atttctct cctgtataa atcctggtg
9481 ctgtctctt atgaggagt gtggcccgt gtcaggcaac gtggcgtggt gtcactgtg
9541 tttctgacg caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct ctttccggg
9601 actttcett tcccctccc tattccaag gcggaactca tgcgcctg cttgcccgc
9661 tctggacag ggcctcggct gttgggact gacaattcc tgggtttgtc ggggaaatca
9721 tctccttc cttggctgt cgcctgtgt gccacctgga ttctgcgccc gacgtcctc
9781 tctacgtcc cttggccct caatccagc gacctctt cccggcct gctgcccgt
9841 ctgcggcctc tccgcgtct tcgctcgc cctcagacga gtcggatct ctttgggccc
9901 gcctcccgc gtcactta agaccaatga ctfacaaggc agctgtagat ctagccact 40

9961 ttttaaaaga aaagggggga ctggaagggc taattcactc ccaacgaaga caagatctgc
 10021 tttttgcttg tactgggtct ctctggtag accagatctg agcctgggag ctctctggct
 10081 aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgtt caagtagtgt
 10141 gtgcccgtct gttgtgtgac tctgtaact agagatccct cagacccttt tagtcagtgt
 10201 ggaaaatctc tagcagggcc cgtttaaacc cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt
 10261 tgccagccat ctgtgtttg cccctcccc gtgccttctc tgaccctgga aggtgccact
 10321 cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat
 10381 tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc
 10441 aggcgatctg ggggatcggt gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac cagctggggc
 10501 tctagggggt atccccacgc gcctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggt
 10561 acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgtttcttc
 10621 ccttctcttc tgcacagtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaactc ggggctccct
 10681 ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctgacccca aaaaactga ttagggtgat
 10741 ggttcacgta gtgggccatc gcctgatag acggttttc gcccttgac gttggagtc
 10801 acgttctta atagtggact ctgttcaa actggaaca cactcaacc tatctcggc
 10861 tattctttg atttataagg gattttgcc atttcggcct attggttaa aaatgagctg
 10921 atttaacaaa aattaacgc gaattaatc tgtggaatgt gtgtcagta ggggtgtgaa
 10981 agtcccagg ctcccagca ggcagaagta tgcaagcat gcactcaat tagtcagcaa
 11041 ccagggtggt aaagtccca ggctcccag caggcagaag tatgcaaagc atgcactca
 11101 attagtcagc aaccatagc ccgcccetaa ctccgccc atcccceta actccgccc
 11161 gttccgccc tttccgccc catggctgac taattttt tattatgca gaggccgagg
 11221 ccgctctgc ctctgagcta tccagaagt agtgaggagg ctttttga ggcctaggct
 11281 tttcaaaaa gctcccggga gctgtatat caatttcgg atctgatcag cacgtgtga
 11341 caattaatca tggcatagt atatggcat agtataatac gacaagggtga ggaactaac
 11401 catggccaag ttgaccagt ccgtccggt gctcaccgc cgcgacgtc ccggagcgg
 11461 cgagtctg accgaccgc tgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgccg
 11521 tgtgtcccg gacgactga cctgttcat cagcgcggc caggaccagg tgggccgga
 11581 caacacctg gcctgggtgt ggtgcccgg cctggacgag ctgtacgccc agtggtcgga
 11641 ggtcgtgtec acgaactcc gggacgctc cgggccggc atgaccgaga tggcgagca
 11701 gccgtgggg cgggagttcg cctgcgca cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc
 11761 cgaggagcag gactgacacg tgctacgaga ttcgaitcc accgccct tctatgaag
 11821 gttggcttc ggaatcgtt tccgggacgc cggctggatg atctccagc gcgggatct
 11881 catgctggag ttctgccc acccaact gttattgca gcttataatg gttacaata
 11941 aagcaatagc atcacaat tcacaaata agcatttt tcaactgcatt ctagtgtg
 12001 tttgtcaaa ctcatcaatg tatctatca tctctgata ccgtcgacct ctgctagag
 12061 cttggcgtaa tcatggtcat agctgttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaatcc
 12121 acacaacata cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagca
 12181 actcacatta attgcgttc gctcactgc cgtttccag tgggaaacc tgcgtgcca
 12241 gctgcattaa tgaatcgcc aacgcgggg gagaggcgg ttgcgtattg ggcgtcttc
 12301 cgttctctc ctaactgact cgctgcctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc
 12361 tcaactaaag gcgtaatac ggttatccac agaactcagg gataacgcag gaaagaacat

10

20

30

40

12421 gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgtttt
 12481 ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg
 12541 aaaccgcaca ggactataaa gataccagge gttccccct ggaagctccc tegtgcgctc
 12601 tectgttccg acctgcccgc ttaccggata cctgtcccgc ttctccctt cgggaagcgt
 12661 ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctc ttcgctcaa
 12721 gctgggctgt gtgcacgaac cccccgtca gcccgaccgc tgcgccttat cgggtaacta
 12781 tegtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa
 12841 caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttctgaagt ggtggcctaa
 12901 ctacggctac actagaagaa cagtattggg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacct
 12961 cggaaaaaga gttgtagct ctgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggtt
 13021 tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat
 13081 cttttctac gggctctgac ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga tttggtcat
 13141 gagattatca aaaaggatct tcacctagat cttttaaat taaaaatgaa gtttaaatc
 13201 aatctaaagt atatatgagt aaacttggc tgacagttac caatgctaa tcaagtggc
 13261 acctatctca gcatctgtc tatttcttc atccatagtt gctgactcc cgtcgtgta
 13321 gataactacg atacgggagg gttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga
 13381 cccacgctca ccggctccag attatcage aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg
 13441 cagaagtggc ctgcaactt taccgctc caccagctt attaattgt gccgggaagc
 13501 tagagtaagt agttcggcag tfaatagtt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat
 13561 cgtggtgta cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc tccggtccc aacgatcaag
 13621 gcgagttaca tgatcccca tttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat
 13681 cgttgcaga agtaagtgg ccgcagtgt atactcatg gttatggcag cactgcataa
 13741 ttcttact gtcatgcat ccgtaagatg cttttctgt actggtgagt actcaacaa
 13801 gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc gagttgctt tccccggcgt caatacggga
 13861 taataccgcg cccatagca gaacttaaa agtgctcacc attggaaaac gttctcggg
 13921 gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgt gagatccagt tcatgtaac ccaactcgtc
 13981 acccaactga tctcagcat ctttacttt caccagcgt tctgggtgag caaaaacagg
 14041 aaggcaaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg aatggtgaa tactcact
 14101 ctctctttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tctctcatga gcggatacat
 14161 atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacattc cccgaaaagt
 14221 gccacctgac

10

20

30

本願明細書に記載の発明は、以下の態様を包含し得る。

[1]

標的RNAについて、CRISPR/Casによる狙いを定めたRNA編集を行うための組み換え発現系であって、

40

(A) RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(dCas)を含むCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質をコードする核酸配列と

(B) (i) 標的アデノシンについて mismatchを含む前記標的RNAに対して相同性の短鎖延長配列、および(ii) dCas スキャフォールド結合配列を含む延長されたシングルガイドRNA(esgRNA)をコードする核酸配列とを含む、前記組み換え発現系。

[2]

前記esgRNAが、(iii) 前記標的RNAに対して相同性の領域を含むスパーサ

50

—配列をさらに含む、上記 [1] に記載の組み換え発現系。

[3]

— (A) および (B) が、同一のベクター内に含まれる、または異なるベクター内に含まれる、上記 [1] に記載の組み換え発現系。

[4]

— 前記 A D A R が、A D A R 1、A D A R 2、および A D A R 3 からなる群から選択される、前述の項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

[5]

— 前記 A D A R の触媒的に活性なデアミナーゼドメインが、A D A R 2 の触媒的に活性なデアミナーゼドメインである、上記 [4] に記載の組み換え発現系。

10

[6]

— 前記 A D A R 2 の触媒的に活性なデアミナーゼドメインが、(1) ヒト A D A R 2 の野生型の触媒的に活性なデアミナーゼドメイン、または (2) 野生型ヒト A D A R 2 と比較して触媒活性が高まっているヒト A D A R 2 の触媒的に活性なデアミナーゼドメインの変異体である、上記 [5] に記載の組み換え発現系。

[7]

— 前記ヒト A D A R 2 の触媒的に活性なデアミナーゼドメインの変異体が、E 4 8 8 Q 変異を含む、上記 [6] に記載の組み換え発現系。

[8]

— 前記 d C a s が、ヌクレアーゼ不活性型 C a s 9 (d C a s 9) である、前述の項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

20

[9]

— 前記 d C a s 9 の N 末端ドメインが、前記 A D A R の触媒的に活性なデアミナーゼドメインの C 末端に融合している、上記 [8] に記載の組み換え発現系。

[1 0]

— 前記 d C a s が、リンカーを介して、前記 A D A R の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合している、前述の項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

[1 1]

— 前記リンカーが、半可動性の X T E N ペプチドリンカーである、上記 [1 0] に記載の組み換え発現系。

30

[1 2]

— 前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、3' 延長配列である、先行する項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

[1 3]

— 前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、標的配列とほぼ完璧な R N A - R N A 塩基対形成する能力を有する相同性の領域を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

[1 4]

— 前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、前記標的 R N A 内のアデノシンについて第 2 のミスマッチをさらに含む、前述の項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

40

[1 5]

— 前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、前記標的 R N A 内のアデノシンについて第 3 のミスマッチ、および任意選択的に前記標的 R N A 内のアデノシンについて第 4 のミスマッチをさらに含む、上記 [1 4] に記載の組み換え発現系。

[1 6]

— 前記 e s g R N A の短鎖延長配列が、長さ約 1 5 ヌクレオチド ~ 約 6 0 ヌクレオチドである、先行する項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

[1 7]

— 前記 e s g R N A が、マーカ配列をさらに含む、先行する項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

50

[1 8]

前記 e s g R N A が、R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター配列をさらに含む、先行する項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

[1 9]

前記 R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター配列が、U 6 プロモーター配列である、上記 [1 8] に記載の組み換え発現系。

[2 0]

前記 e s g R N A が、スペーサー配列とスキヤフォールド配列の間にリンカー配列を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

[2 1]

前記 e s g R N A (i)、(i i)、および (i i i) の配列が、前記 e s g R N A 内で 3 ' から 5 ' に向かって位置している、上記 [2] に記載の組み換え発現系。

[2 2]

P A M 配列をコードする核酸をさらに含む、先行する項目のいずれか一項に記載の組み換え発現系。

[2 3]

前記ベクターが、ウイルスベクターである、上記 [3] に記載の組み換え発現系。

[2 4]

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクター (A A V)、レンチウイルスベクター、またはアデノウイルスベクターである、上記 [2 2] に記載の組み換え発現系。

[2 5]

延長されたシングルガイド R N A (e s g R N A) をコードする核酸を含むベクターであって、

(i) 標的アデノシンについて mismatches を含む標的 R N A に対して相同性の短鎖延長配列と、

(i i) d C a s スキヤフォールド結合配列と、

(i i i) 標的配列に対して相補的な配列 (スペーサー配列) と、

を含み、(i)、(i i)、および (i i i) が、前記 e s g R N A 内で 3 ' から 5 ' に向かって位置している、前記ベクター。

[2 6]

ウイルスベクターである、上記 [2 5] に記載のベクター。

[2 7]

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスベクター (A A V)、レンチウイルスベクター、またはアデノウイルスベクターである、上記 [2 6] に記載のベクター。

[2 8]

発現コントロール要素をさらに含む、上記 [2 5] から [2 7] のいずれか一項に記載のベクター。

[2 9]

上記 [2 5] から [2 8] のいずれか一項に記載のベクターを含むウイルス粒子。

[3 0]

上記 [1] から [2 4] に記載の組み換え発現系、上記 [2 5] から [2 8] に記載のベクター、または上記 [2 9] に記載のウイルス粒子のうちのいずれか 1 つを含む細胞。

[3 1]

(i) 標的アデノシンについて mismatches を含む標的 R N A に対して相同性の短鎖延長配列と、

(i i) d C a s スキヤフォールド結合配列と

を含む、e s g R N A。

[3 2]

A D A R の触媒的に活性なデアミナーゼドメインに融合したヌクレアーゼ不活性型 C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼ (d C a s) を含む、C R I S P R / C a s R N A 編

10

20

30

40

50

集融合タンパク質。

[3 3]

選択的RNA編集を行う方法であって、
上記[1]から[2 4]に記載の組み換え発現系、上記[2 5]から[2 8]に記載のベクター、または上記[2 9]に記載のウイルス粒子のうちのいずれか1つを細胞に投与することを含む、方法。

[3 4]

2' OMe RNAとDNA塩基の繰り返しを含むアンチセンス合成オリゴヌクレオチド化合物(PAMmer)を投与することをさらに含む、上記[3 3]に記載の方法。

[3 5]

In vitro法またはin vivo法である、上記[3 3]または[3 4]に記載の方法。

[3 6]

狙いを定めた細胞RNA編集がプロセッシングおよび動力学に及ぼす効果を特徴づける方法であって、

上記[1]から[2 4]に記載の組み換え発現系、上記[2 5]から[2 8]に記載のベクター、上記[2 9]に記載のウイルス粒子、または上記[3 0]に記載の細胞のうちのいずれか1つをサンプルに対して投与すること、およびその効果を決定することを含む、方法。

[3 7]

前記サンプルが、対象に由来する、上記[3 6]に記載の方法。

[3 8]

対象における疾患または状態を治療する方法であって、

上記[1]から[2 4]に記載の組み換え発現系、上記[2 5]から[2 8]に記載のベクター、上記[2 9]に記載のウイルス粒子、または上記[3 0]に記載の細胞のうちのいずれか1つを、対象または対象から単離されたサンプルに対して投与することを含む、方法。

[3 9]

標的RNAにおいて、GからAへの変異の修正をさらに含む、上記[3 8]に記載の方法。

[4 0]

前記疾患が、ハーラー症候群、嚢胞性線維症、筋ジストロフィー、脊髄損傷、脳卒中、外傷性脳損傷、聴覚消失(ノイズへの過剰暴露または聴器毒性による)、多発性硬化症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、アルコール中毒症、アルコール離脱症候、過急速ベンゾジアゼピン離脱症候群、およびハンチントン病の群から選択される、上記[3 8]または[3 9]に記載の方法。

[4 1]

(A)

(i) 上記[1]から[2 4]のいずれか一項に記載の組み換え発現系、
(ii) 上記[2 5]から[2 8]のいずれか一項に記載のベクター、
(iii) 上記[2 9]に記載のウイルス粒子、および/または
(iv) 上記[3 0]に記載の細胞、
(v) 上記[3 1]に記載のesgRNA、
(vi) および、上記[3 2]に記載のCRISPR/Cas RNA編集融合タンパク質

のうちの1つまたは複数と、

(B) 使用説明書と

を含む、キット。

[4 2]

前記説明書が、上記[3 3]から[4 0]に記載の方法のいずれか1つによる使用のため

10

20

30

40

50

めのものである、上記 [4 1] に記載のキット。

【 図 面 】

【 図 1 】

図 1A

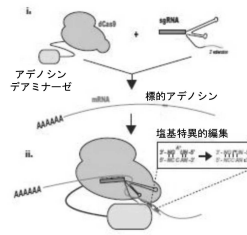


図 1B

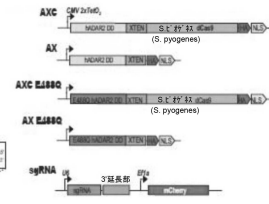


図 1C

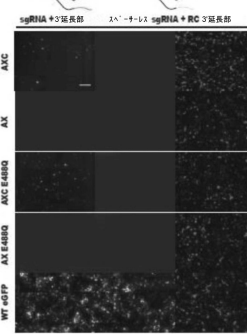
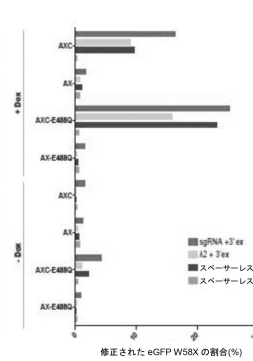


図 1D



【 図 2 】

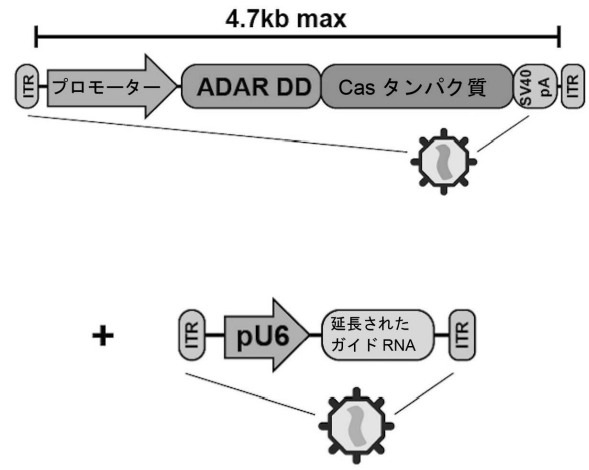


図 2

【 図 3 】

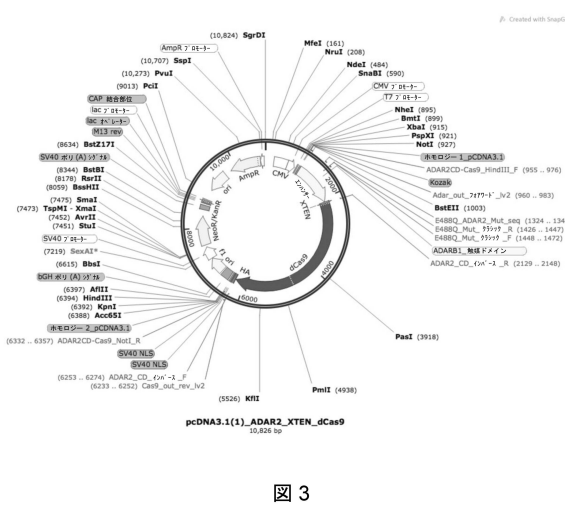


図 3

【 図 4 】

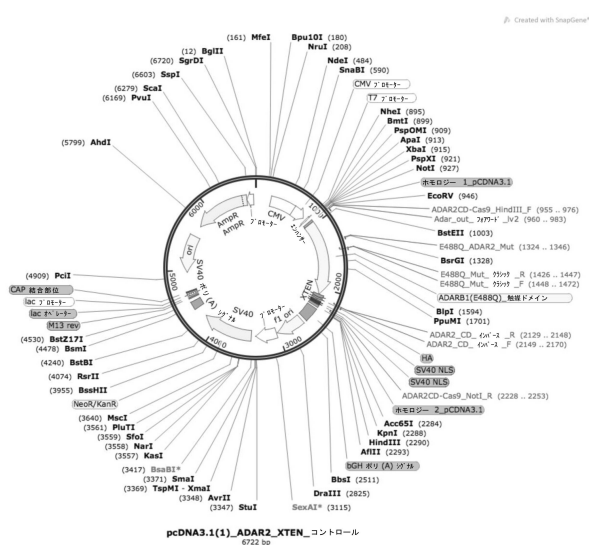


図 4

10

20

30

40

50

【図 9】

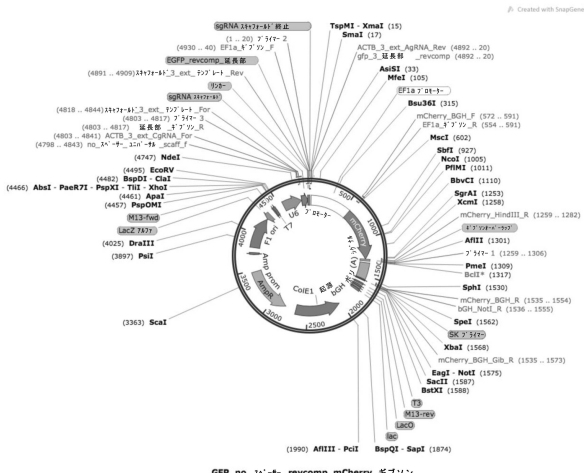


図 9

【図 10】

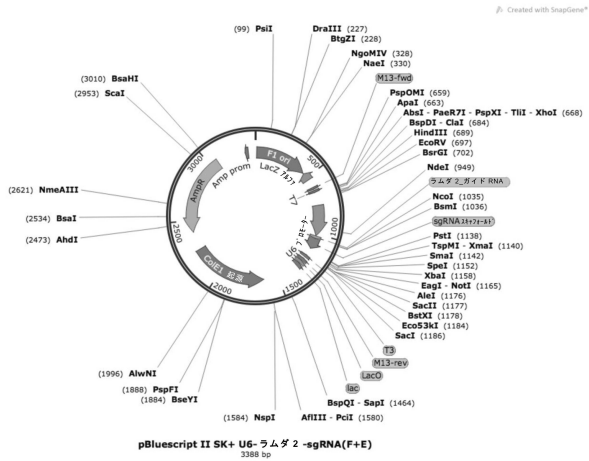


図 10

【図 11】

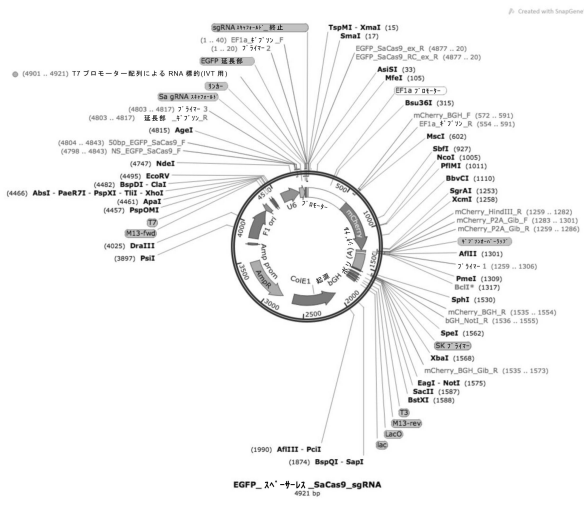


図 11

【図 12】

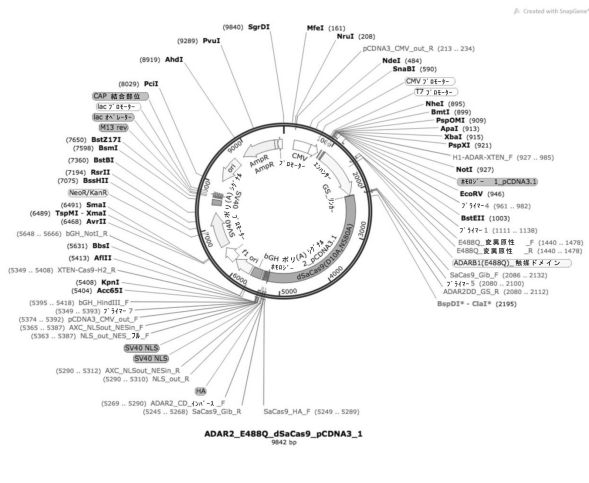


図 12

10

20

30

40

50

【 図 13 - 1 】

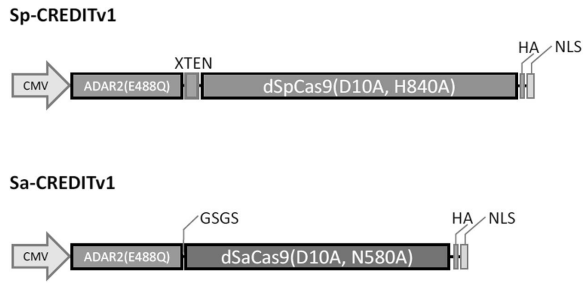
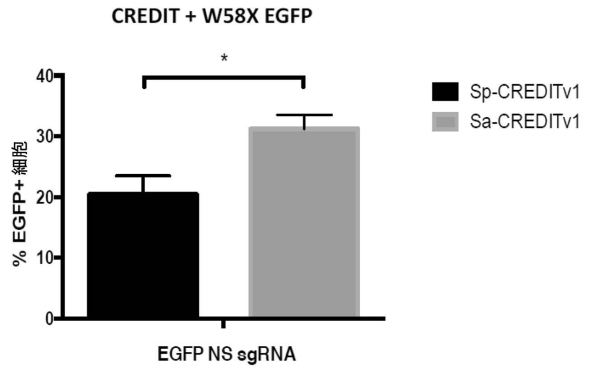


図 13A

【 図 13 - 2 】



* < 0.05 一元配置 ANOVA での p 値

図 13B

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 7/01 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7105(2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 P 3/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/04 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 25/32 (2006.01)
 A 6 1 P 25/36 (2006.01)

F I

C 1 2 N 7/01
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 0 7 K 19/00
 A 6 1 K 31/7105
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/32
 A 6 1 P 25/36

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者

ヨー, ユージン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 9 3 メール コード: 0 9 1 0, ラ ジョラ, ギルマン
 ドライヴ 9 5 0 0 ユーシー サンディエゴ内

(72)発明者

ブラナン, クリストファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 9 3 メール コード: 0 9 1 0, ラ ジョラ, ギルマン
 ドライヴ 9 5 0 0 ユーシー サンディエゴ内

(72)発明者

マリナ, ライアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 9 3 メール コード: 0 9 1 0, ラ ジョラ, ギルマン
 ドライヴ 9 5 0 0 ユーシー サンディエゴ内

(72)発明者

ネレス, デイヴィッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 9 3 メール コード: 0 9 1 0, ラ ジョラ, ギルマン
 ドライヴ 9 5 0 0 ユーシー サンディエゴ内

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 2 8 9 6 5 9 (U S , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 7 2 1 2 (W O , A 1)

Nucleic Acids Res., 2016, 44(20), p.9872-9880

(58)調査した分野

(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 /

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)