(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-508362
(P2023-508362A)
(43)公表日　令和5年3月2日(2023.3.2)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 14/195	*(2006.01)*	C07K	14/195	ZNA	4B029
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12N	15/09	110	4B050
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	19/00		4B063
C12N 9/16	*(2006.01)*	C12N	9/16	Z	4B065
C12N 15/62	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全203頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-538726(P2022-538726)
(86)(22)出願日　令和2年12月22日(2020.12.22)
(85)翻訳文提出日　令和4年8月19日(2022.8.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/066672
(87)国際公開番号　WO2021/133829
(87)国際公開日　令和3年7月1日(2021.7.1)
(31)優先権主張番号　62/952,909
(32)優先日　令和1年12月23日(2019.12.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　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 University of California
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４６０７－５２００，オークランド，フランクリン ストリート １１１１，１２番 フロア
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名 雅夫
(74)代理人　100160923
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳエフェクターポリペプチド及びその使用方法

(57)【要約】
本開示は、ＲＮＡ誘導ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、それをコードする核酸、及びそれを含む組成物を提供する。本開示は、本開示のＲＮＡ誘導ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質と、ガイドＲＮＡとを含む、リボ核タンパク質複合体を提供する。本開示は、本開示のＲＮＡ誘導ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質及びガイドＲＮＡを使用して、標的核酸を修飾する方法を提供する。
【選択図】図１

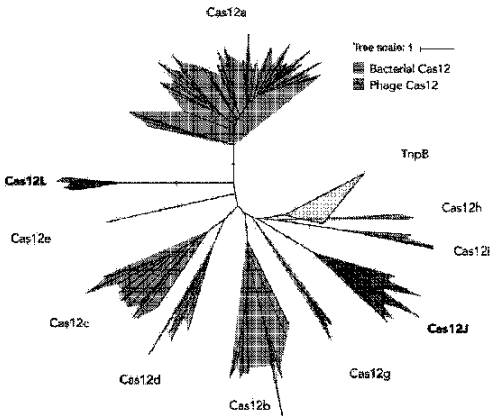


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする核酸分子と、
ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、または前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡ分子と
を含む、組成物。
【請求項２】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して５０％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、図７、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される前記ｃｒＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項１または請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、核局在化シグナル（ＮＬＳ）と融合している、請求項１または請求項２に記載の組成物。
【請求項５】
脂質を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】
ａ）及びｂ）が、リポソーム内にある、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
ａ）及びｂ）が、粒子内にある、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
緩衝液、ヌクレアーゼ阻害剤、及びプロテアーゼ阻害剤のうちの１つ以上を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、二本鎖標的核酸分子の一方の鎖のみを切断することができるニッカーゼである、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、触媒的に不活性なＣａｓ１２Ｌポリペプチド（ｄＣａｓ１２Ｌ）である、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、７００アミノ酸～８００アミノ酸の長さを有する、請求項１～１１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３】
ＤＮＡドナー鋳型をさらに含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４】
異種ポリペプチドと融合したＣａｓ１２Ｌポリペプチドを含む、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項１５】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して５０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１４に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項１６】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１４に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項１７】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、二本鎖標的核酸分子の一方の鎖のみを切断することができるニッカーゼである、請求項１４～１６のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項１８】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、触媒的に不活性なＣａｓ１２Ｌポリペプチド（ｄＣａｓ１２Ｌ）である、請求項１４～１７のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項１９】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、７００アミノ酸～８００アミノ酸の長さを有する、請求項１４～１８のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２０】
前記異種ポリペプチドが、前記Ｃａｓ１２ＬポリペプチドのＮ末端及び／またはＣ末端と融合している、請求項１４～１９のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２１】
核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含む、請求項１４～２０のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２２】
前記異種ポリペプチドが、標的細胞または標的細胞型上の細胞表面部分への結合を提供する標的指向ポリペプチドである、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２３】
前記異種ポリペプチドが、酵素活性を示す、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２４】
前記異種ポリペプチドが、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、及びグリコシラーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、請求項２３に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２５】
前記異種ポリペプチドが、逆転写酵素活性、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、脱アミノ化活性、脱プリン化活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、及びリコンビナーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、請求項２３に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２６】
前記異種ポリペプチドが、標的核酸と会合した標的ポリペプチドを修飾する酵素活性を示す、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２７】
前記異種ポリペプチドが、ヒストン修飾活性を示す、請求項２６に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【請求項２８】
前記異種ポリペプチドが、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、

ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、脱ミリストイル化活性、グリコシル化活性（例えば、Ｏ－ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼからの）、及び脱グリコシル化活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、請求項２６または請求項２７に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項２９】

前記異種ポリペプチドが、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、及びデアセチラーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、請求項２８に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３０】

前記異種ポリペプチドが、エンドソーム脱出ポリペプチドである、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３１】

前記エンドソーム脱出ポリペプチドが、ＧＬＦＸＡＬＬＸＬＬＸＳＬＷＸＬＬＬＸＡ（配列番号７２）、及びＧＬＦＨＡＬＬＨＬＬＨＳＬＷＨＬＬＬＨＡ（配列番号７３）から選択されるアミノ酸配列を含み、配列中、各Ｘが、独立して、リジン、ヒスチジン、及びアルギニンから選択される、請求項３０に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３２】

前記異種ポリペプチドが、葉緑体輸送ペプチドである、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３３】

前記異種ポリペプチドが、タンパク質形質導入ドメインを含む、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３４】

前記異種ポリペプチドが、転写を増加または減少させるタンパク質である、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３５】

前記異種ポリペプチドが、転写リプレッサードメインである、請求項３４に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３６】

前記異種ポリペプチドが、転写活性化ドメインである、請求項３４に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３７】

前記異種ポリペプチドが、タンパク質結合ドメインである、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【請求項３８】

請求項１４～３７のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項３９】

前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項３８に記載の核酸。

【請求項４０】

前記プロモーターが、真核細胞で機能する、請求項３９に記載の核酸。

【請求項４１】

前記プロモーターが、植物細胞、真菌細胞、動物細胞、無脊椎動物の細胞、ハエ細胞、脊椎動物の細胞、哺乳類細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞のうちの１つ以上で機能する、請求項４０に記載の核酸。

【請求項４２】

前記プロモーターが、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、細胞型特異的プロモーター、及び組織特異的プロモーターのうちの１つ以上である、請求項３９～４１のいず

れか一項に記載の核酸。
【請求項４３】
組み換え発現ベクターである、請求項３８～４２のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項４４】
前記組み換え発現ベクターが、組み換えアデノ随伴ウイルスベクター、組み換えレトロウイルスベクター、または組み換えレンチウイルスベクターである、請求項４３に記載の核酸。
【請求項４５】
前記プロモーターが、原核細胞で機能する、請求項３９に記載の核酸。
【請求項４６】
前記核酸分子が、ｍＲＮＡである、請求項３８に記載の核酸。
【請求項４７】
（ａ）Ｃａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡをコードするヌクレオチド配列と、
（ｂ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と
を含む、１つ以上の核酸。
【請求項４８】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して５０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項４７に記載の１つ以上の核酸。
【請求項４９】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸に対して８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項４７に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５０】
前記Ｃａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡが、図７、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに記載されるｃｒＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して８０％以上のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項４７～４９のいずれか一項に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５１】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、核局在化シグナル（ＮＬＳ）と融合している、請求項４７～５０のいずれか一項に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５２】
前記Ｃａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡをコードする前記ヌクレオチド配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項４７～５１のいずれか一項に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５３】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項４７～５２のいずれか一項に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５４】
前記Ｃａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡをコードする前記ヌクレオチド配列に作動可能に連結されている前記プロモーター、及び／または前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列に作動可能に連結されている前記プロモーターが、真核細胞で機能する、請求項５２または請求項５３に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５５】
前記プロモーターが、植物細胞、真菌細胞、動物細胞、無脊椎動物の細胞、ハエ細胞、脊椎動物の細胞、哺乳類細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞のうちの１つ以上で機能する、請求項５４に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５６】
前記プロモーターが、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、細胞型特異的プロモーター、及び組織特異的プロモーターのうちの１つ以上である、請求項５３～５５のいずれか一項に記載の１つ以上の核酸。

【請求項５７】
１つ以上の組み換え発現ベクターである、請求項４７～５６のいずれか一項に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５８】
前記１つ以上の組み換え発現ベクターが、１つ以上のアデノ随伴ウイルスベクター、１つ以上の組み換えレトロウイルスベクター、または１つ以上の組み換えレンチウイルスベクターから選択される、請求項５７に記載の１つ以上の核酸。
【請求項５９】
前記プロモーターが、原核細胞で機能する、請求項５３に記載の１つ以上の核酸。
【請求項６０】
ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、
ｂ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及び
ｃ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、または前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸
のうちの１つ以上を含む、真核細胞。
【請求項６１】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記細胞のゲノムＤＮＡに組み込まれている、請求項６０に記載の真核細胞。
【請求項６２】
植物細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、クモ類細胞、真菌細胞、鳥類細胞、爬虫類細胞、両生類細胞、無脊椎動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、またはヒト細胞である、請求項６０または請求項６１に記載の真核細胞。
【請求項６３】
Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むことを含む、細胞。
【請求項６４】
原核細胞である、請求項６３に記載の細胞。
【請求項６５】
前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む前記核酸を含み、前記核酸分子が、前記細胞のゲノムＤＮＡに組み込まれている、請求項６３または請求項６４に記載の細胞。
【請求項６６】
標的核酸を修飾する方法であって、前記方法が、
前記標的核酸を、
ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、及び
ｂ）前記標的核酸の標的配列にハイブリダイズするガイド配列を含むＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ
と接触させる工程
を含み、
前記接触させる工程が、前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドによる前記標的核酸の修飾をもたらす、
前記方法。
【請求項６７】
前記修飾が、前記標的核酸の切断である、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記標的核酸が、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、ＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、及び染色体外ＤＮＡから選択される、請求項６６または請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】

前記接触させる工程が、細胞の外部でインビトロで起こる、請求項６６～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０】
前記接触させる工程が、培養中の細胞の内部で起こる、請求項６６～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１】
前記接触させる工程が、インビボで細胞の内部で起こる、請求項６６～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
前記細胞が、真核細胞である、請求項７０または請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
前記細胞が、植物細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、爬虫類細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、魚類細胞、寄生虫細胞、節足動物細胞、無脊椎動物の細胞、脊椎動物の細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞から選択される、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記細胞が、原核細胞である、請求項７０または請求項７１に記載の方法。
【請求項７５】
前記接触させる工程が、ゲノム編集をもたらす、請求項６６～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
前記接触させる工程が、細胞に、（ａ）前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及び（ｂ）前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、または前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を導入することを含む、請求項６６～７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７】
前記接触させる工程が、ＤＮＡドナー鋳型を前記細胞に導入することをさらに含む、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、図７、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに記載されるｃｒＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して８０％以上のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項６６～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、核局在化シグナルと融合している、請求項６６～７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
標的ＤＮＡからの転写を調節する方法、標的核酸を修飾する方法、または標的核酸と会合したタンパク質を修飾する方法であって、
前記標的核酸を、
ａ）異種ポリペプチドと融合したＣａｓ１２Ｌポリペプチドを含むＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、及び
ｂ）前記標的核酸の標的配列にハイブリダイズするガイド配列を含むＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ
と接触させる工程
を含む、前記方法。
【請求項８１】
前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、図７、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに記載されるｃｒＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して８０％以上のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項８０に記載の方法。

【請求項８２】
前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドが、核局在化シグナルを含む、請求項８０または請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
前記修飾が、前記標的核酸の切断ではない、請求項８０～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４】
前記標的核酸が、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、ＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、及び染色体外ＤＮＡから選択される、請求項８０～８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５】
前記接触させる工程が、細胞の外部でインビトロで起こる、請求項８０～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６】
前記接触させる工程が、培養中の細胞の内部で起こる、請求項８０～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７】
前記接触させる工程が、インビボで細胞の内部で起こる、請求項８０～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
前記細胞が、真核細胞である、請求項８６または請求項８７に記載の方法。
【請求項８９】
前記細胞が、植物細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、爬虫類細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、魚類細胞、寄生虫細胞、節足動物細胞、無脊椎動物の細胞、脊椎動物の細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞から選択される、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
前記細胞が、原核細胞である、請求項８６または請求項８７に記載の方法。
【請求項９１】
前記接触させる工程が、細胞に、（ａ）前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及び（ｂ）前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、または前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を導入することを含む、請求項８０～９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９２】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、触媒的に不活性なＣａｓ１２Ｌポリペプチド（ｄＣａｓ１２Ｌ）である、請求項８０～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３】
前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、７００アミノ酸～８００アミノ酸の長さを有する、請求項８０～９２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９４】
前記異種ポリペプチドが、酵素活性を示す、請求項８０～９３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９５】
前記異種ポリペプチドが、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、及びグリコシラーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】

前記異種ポリペプチドが、逆転写酵素活性、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、脱アミノ化活性、脱プリン化活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、及びリコンビナーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、請求項９４に記載の方法。

【請求項９７】

前記異種ポリペプチドが、標的核酸と会合した標的ポリペプチドを修飾する酵素活性を示す、請求項８０～９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９８】

前記異種ポリペプチドが、ヒストン修飾活性を示す、請求項９７に記載の方法。

【請求項９９】

前記異種ポリペプチドが、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、脱ミリストイル化活性、グリコシル化活性（例えば、Ｏ－ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼからの）、及び脱グリコシル化活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、請求項９７または請求項９８に記載の方法。

【請求項１００】

前記異種ポリペプチドが、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、及びデアセチラーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、請求項９９に記載の方法。

【請求項１０１】

前記異種ポリペプチドが、転写を増加または減少させるタンパク質である、請求項８０～９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０２】

前記異種ポリペプチドが、転写リプレッサードメインである、請求項１０１に記載の方法。

【請求項１０３】

前記異種ポリペプチドが、転写活性化ドメインである、請求項１０１に記載の方法。

【請求項１０４】

前記異種ポリペプチドが、タンパク質結合ドメインである、請求項８０～９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０５】

トランスジェニック多細胞非ヒト生物であって、そのゲノムが、

ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、

ｂ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、及び

ｃ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ

のうちの１つ以上をコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、前記トランスジェニック多細胞非ヒト生物。

【請求項１０６】

前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸配列に対して５０％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１０５に記載のトランスジェニック多細胞非ヒト生物。

【請求項１０７】

前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸配列に対して８５％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１０５に記載のトランスジェニック多細胞非ヒト生物。

【請求項１０８】

前記生物が、植物、単子葉植物、双子葉植物、無脊椎動物、昆虫、節足動物、クモ類、寄生虫、蠕虫、刺胞動物、脊椎動物、魚類、爬虫類、両生類、有蹄類、鳥類、ブタ、ウマ、ヒツジ、齧歯類、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である、請求項１０５～１０７のいずれか一項に記載のトランスジェニック多細胞非ヒト生物。

【請求項１０９】

ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、

ｂ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＤＮＡドナー鋳型、

ｃ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、

ｄ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＤＮＡドナー鋳型、

ｅ）Ｃａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、

ｆ）Ｃａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＤＮＡドナー鋳型、

ｇ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、

ｈ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＤＮＡドナー鋳型、

ｉ）ｉ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列とを含む、１つ以上の組み換え発現ベクター、

ｊ）ｉ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉｉ）ＤＮＡドナー鋳型とを含む、１つ以上の組み換え発現ベクター、

ｋ）ｉ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列とを含む、１つ以上の組み換え発現ベクター、ならびに

ｌ）ｉ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列と、ＤＮＡドナー鋳型とを含む、１つ以上の組み換え発現ベクター

を含む、システム。

【請求項１１０】

前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して５０％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１０９に記載のＣａｓ１２Ｌシステム。

【請求項１１１】

前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して８５％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１０９に記載のＣａｓ１２Ｌシステム。

【請求項１１２】

前記ドナー鋳型核酸が、８ヌクレオチド～１０００ヌクレオチドの長さを有する、請求項１０９～１１１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌシステム。

【請求項１１３】

前記ドナー鋳型核酸が、２５ヌクレオチド～５００ヌクレオチドの長さを有する、請求項１０９～１１１のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌシステム。

【請求項１１４】

請求項１０９～１１３のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌシステムを含む、キット。

【請求項１１５】

前記キットの構成要素が、同じ容器中にある、請求項１１４に記載のキット。
【請求項１１６】
前記キットの構成要素が、別個の容器中にある、請求項１１４に記載のキット。
【請求項１１７】
請求項１０９～１１６のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌシステムを含む、滅菌容器。
【請求項１１８】
前記容器が、シリンジである、請求項１１７に記載の滅菌容器。
【請求項１１９】
請求項１０９～１１６のいずれか一項に記載のＣａｓ１２Ｌシステムを含む、埋め込み型デバイス。
【請求項１２０】
前記Ｃａｓ１２Ｌシステムが、マトリックス内にある、請求項１１９に記載の埋め込み型デバイス。
【請求項１２１】
前記Ｃａｓ１２Ｌシステムが、リザーバ中にある、請求項１１９に記載の埋め込み型デバイス。
【請求項１２２】
試料中の標的ＤＮＡを検出する方法であって、
（ａ）前記試料を、
（ｉ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、
（ｉｉ）前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合する領域と、前記標的ＤＮＡとハイブリダイズするガイド配列とを含む、ガイドＲＮＡ、及び
（ｉｉｉ）一本鎖であり、かつ前記ガイドＲＮＡの前記ガイド配列とハイブリダイズしない、検出器核酸
と接触させる工程と、
（ｂ）前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドによる前記一本鎖検出器核酸の切断によって生成される検出可能なシグナルを測定する工程であって、それにより、前記標的ＤＮＡを検出する、測定する工程と
を含む、前記方法。
【請求項１２３】
前記標的ＤＮＡが、細菌ＤＮＡである、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１２４】
前記標的ＤＮＡが、ウイルスＤＮＡである、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１２５】
前記標的ＤＮＡが、パポバウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヘパドナウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、またはパルボウイルスＤＮＡである、請求項１２４に記載の方法。
【請求項１２６】
前記標的ＤＮＡが、ヒト細胞由来である、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１２７】
前記標的ＤＮＡが、ヒト胎児ＤＮＡまたはがん細胞ＤＮＡである、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１２８】
前記試料が、細胞溶解物を含む、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１２９】
前記試料が、細胞を含む、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１３０】

前記試料が、血液、血清、血漿、尿、吸引液、または生検試料である、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１３１】
前記試料中に存在する前記標的ＤＮＡの量を決定する工程をさらに含む、請求項１２２～１３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３２】
前記検出可能なシグナルを測定する工程が、視覚ベースの検出、センサーベースの検出、色検出、金ナノ粒子ベースの検出、蛍光偏光、コロイド相転移／分散、電気化学検出、及び半導体ベースの感知のうちの１つ以上を含む、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３３】
前記標識された検出器核酸が、ＤＮＡである、請求項１２２～１３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３４】
前記標識された検出器核酸が、ＲＮＡである、請求項１２２～１３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３５】
前記標識された検出器核酸が、修飾核酸塩基、修飾糖部分、及び／または修飾核酸連結を含む、請求項１２２～１３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３６】
前記検出可能なシグナルが、４５分未満で検出可能である、請求項１２２～１３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３７】
前記検出可能なシグナルが、３０分未満で検出可能である、請求項１２２～１３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３８】
ループ介在等温増幅（ＬＡＭＰ）、ヘリカーゼ依存型増幅（ＨＤＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、核酸配列ベースの増幅（ＮＡＳＢＡ）、転写媒介増幅（ＴＭＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、複数置換増幅（ＭＤＡ）、分岐（ＲＡＭ）、環状ヘリカーゼ依存型増幅（ｃＨＤＡ）、単一プライマー等温増幅（ＳＰＩＡ）、ＲＮＡ技術のシグナル媒介増幅（ＳＭＡＲＴ）、自家持続配列複製（３ＳＲ）、ゲノムの指数的増幅反応（ＧＥＡＲ）、または等温複数置換増幅（ＩＭＤＡ）により、前記試料中の前記標的ＤＮＡを増幅する工程をさらに含む、請求項１２２～１３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３９】
前記試料中の標的ＤＮＡが、１０ａＭ未満の濃度で存在する、請求項１２２～１３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４０】
前記標識された検出器核酸の前記標識が、蛍光発光色素対を含む、請求項１２２～１３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４１】
前記蛍光発光色素対が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対である、請求項１４０に記載の方法。
【請求項１４２】
前記蛍光発光色素対が、クエンチャー／蛍光体対である、請求項１４０に記載の方法。
【請求項１４３】
前記標識された検出器核酸が、２つ以上の蛍光発光色素対を含む、請求項１４２～１４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４４】
前記２つ以上の蛍光発光色素対が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対及びクエンチャー／蛍光体対を含む、請求項１４３に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０１９年１２月２３日に出願された米国仮特許出願第６２／９５２，９０９号の利益を主張するものであり、この出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
序文
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、外来ＤＮＡまたはＲＮＡの獲得、標的化、及び切断に関与するＣａｓタンパク質と、Ｃａｓタンパク質に結合するセグメント及び標的核酸に結合するセグメントを含むガイドＲＮＡ（複数可）とを含む。例えば、クラス２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、ガイドＲＮＡに結合した単一のＣａｓタンパク質を含み、このＣａｓタンパク質が、標的とされた核酸に結合し、それを切断する。これらのシステムのプログラム可能な性質は、標的核酸の修飾に使用するための汎用性の高い技術としてそれらを使用することを容易にしている。
【発明の概要】
【０００３】
概要
本開示は、ＲＮＡ誘導ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、それをコードする核酸、及びそれを含む組成物を提供する。本開示は、本開示のＲＮＡ誘導ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質と、ガイドＲＮＡとを含む、リボ核タンパク質複合体を提供する。本開示は、本開示のＲＮＡ誘導ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質及びガイドＲＮＡを使用して、標的核酸を修飾する方法を提供する。
【図面の簡単な説明】
【０００４】
【図１】１０００回反復した多重配列アライメントから作成された、Ｃａｓ１２スーパーファミリーの最尤系統樹を提示する。Ｃａｓ１２Ｌは、他のＣａｓ１２タンパク質から分離した明確に異なるクレードを形成する。
【図２Ａ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｂ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｃ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｄ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｅ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｆ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｇ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｈ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｉ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｊ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｋ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｌ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｍ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｎ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｏ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｐ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｑ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｒ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｓ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｔ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｕ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。

【図２Ｖ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｗ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｘ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｙ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２Ｚ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＡＡ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＢＢ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＣＣ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＤＤ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＥＥ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＦＦ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＧＧ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＨＨ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＩＩ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＪＪ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＫＫ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＬＬ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＭＭ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＮＮ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＯＯ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＰＰ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＱＱ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＲＲ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＳＳ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＴＴ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＵＵ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＶＶ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＷＷ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＸＸ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＹＹ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＺＺ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＡＡＡ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＢＢＢ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＣＣＣ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＤＤＤ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＥＥＥ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図２ＦＦＦ】Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。
【図３Ａ】Ｃａｓ１２ＬポリペプチドのＲｕｖＣ－Ｉ、ＲｕｖＣ－ＩＩ、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインの活性部位残基の箇所を提供する。
【図３Ｂ】Ｃａｓ１２ＬポリペプチドのＲｕｖＣ－Ｉ、ＲｕｖＣ－ＩＩ、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインの活性部位残基の箇所を提供する。
【図４】活性部位がアノテーションされたＣＲＩＳＰＲ遺伝子座アーキテクチャを図示する。
【図５Ａ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｂ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提

供する。
【図５Ｃ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｄ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｅ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｆ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｇ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｈ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｉ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｊ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｋ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｌ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｍ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｎ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｏ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ

１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図５Ｐ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１０２～１１２、１１２、１１３～１２６、１０２、１２７～１３７、１５７、１３８～１５６）のアライメントを提供する。
【図６Ａ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される選択されたＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１５８～１６１、１４２～１４４）のアライメントを提供する。
【図６Ｂ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される選択されたＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１５８～１６１、１４２～１４４）のアライメントを提供する。
【図６Ｃ】図２Ａ～２Ｚ、２ＡＡ～２ＺＺ、及び２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される選択されたＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列（上から下に、配列番号１５８～１６１、１４２～１４４）のアライメントを提供する。
【図７】Ｃａｓ－ラムダ（Ｌａｍｂｄａ）（Ｃａｓ１２Ｌ）ガイドＲＮＡのリピート領域のヌクレオチド配列（上から下に、配列番号６３、７０、６４、１６３、５９、６５、６０、６８、６６、６１、１６４、６７、６９）のアライメントを提供する。コンセンサス配列が提供される（配列番号１６２）。
【図８Ａ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｂ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｃ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｄ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｅ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｆ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｇ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｈ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｉ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｊ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｋ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｌ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図８Ｍ】様々なＣａｓ－ラムダガイドＲＮＡリピート配列の二次構造を図示する。
【図９】ＰＡＭ分析の結果を図示する。
【図１０】プラスミドｐＢＡＳ１２－Ｌ１－ＮＴアレイの概略図を提供する。
【図１１】プラスミドｐＢＡＳ１８の概略図を提供する。
【図１２Ａ】ＧＦＰ標的指向ガイド（ｐＢＡＳ４４）を伴うＣａｓλが、非標的指向ガイド（ｐＢＡＳ１２）を伴うＣａｓλの陰性対照と比較して、コロニー形成単位（細胞生存率の代理として）における複数桁の低減を示したことを示すデータを図示する。別のオルソログ由来のリピート単位を使用したＧＦＰ標的指向ガイドを伴うＣａｓλもまた、ＧＦＰの阻害された増殖及び除去を示した。
【図１２Ｂ】ＧＦＰ標的指向ガイド（ｐＢＡＳ４４）を伴うＣａｓλが、非標的指向ガイド（ｐＢＡＳ１２）を伴うＣａｓλの陰性対照と比較して、コロニー形成単位（細胞生存率の代理として）における複数桁の低減を示したことを示すデータを図示する。別のオルソログ由来のリピート単位を使用したＧＦＰ標的指向ガイドを伴うＣａｓλもまた、ＧＦＰの阻害された増殖及び除去を示した。
【図１２Ｃ】ＧＦＰ標的指向ガイド（ｐＢＡＳ４４）を伴うＣａｓλが、非標的指向ガイド（ｐＢＡＳ１２）を伴うＣａｓλの陰性対照と比較して、コロニー形成単位（細胞生存率の代理として）における複数桁の低減を示したことを示すデータを図示する。別のオルソログ由来のリピート単位を使用したＧＦＰ標的指向ガイドを伴うＣａｓλもまた、ＧＦ

Ｐの阻害された増殖及び除去を示した。
【発明を実施するための形態】
【０００５】
定義
本明細書で互換的に使用される「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかである、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。したがって、この用語は、一本鎖、二本鎖、もしくは多重鎖ＤＮＡまたはＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、あるいはプリン及びピリミジン塩基または他の天然の、化学的もしくは生化学的に改変された、非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーを含むが、これらに限定されない。
【０００６】
「ハイブリダイゼーション可能」または「相補的」または「実質的に相補的」とは、核酸（例えば、ＲＮＡ、ＤＮＡ）が、適切なインビトロ及び／またはインビボの温度及び溶液イオン強度条件下で、配列特異的、反平行な様態で別の核酸に非共有結合性で結合すること、すなわち、ワトソン－クリック塩基対及び／またはＧ／Ｕ塩基対を形成するか、「アニール」するか、または「ハイブリダイズする」ことを可能にするヌクレオチドの配列を含むことを意味する。標準的なワトソン－クリック塩基対合には、チミジン（Ｔ）と対合するアデニン（Ａ）、ウラシル（Ｕ）と対合するアデニン（Ａ）、及びシトシン（Ｃ）と対合するグアニン（Ｇ）［ＤＮＡ、ＲＮＡ］が含まれる。加えて、２つのＲＮＡ分子（例えば、ｄｓＲＮＡ）間のハイブリダイゼーションに関して、及びＲＮＡ分子とのＤＮＡ分子のハイブリダイゼーションに関して（例えば、ＤＮＡ標的核酸塩基がガイドＲＮＡと対合する場合等）、グアニン（Ｇ）はまた、ウラシル（Ｕ）と塩基対合することができる。例えば、Ｇ／Ｕ塩基対合は、ｍＲＮＡ中のコドンとのｔＲＮＡアンチコドン塩基対合の関連において、遺伝コードの縮重（すなわち冗長性）に少なくとも部分的に関与する。したがって、本開示の関連において、（例えば、ガイドＲＮＡ分子のｄｓＲＮＡ二重鎖の；標的核酸と対合するガイドＲＮＡ塩基等の）グアニン（Ｇ）は、ウラシル（Ｕ）及びアデニン（Ａ）の両方に相補的であると見なされる。例えば、ガイドＲＮＡ分子のｄｓＲＮＡ二重鎖の所与のヌクレオチド位置でＧ／Ｕ塩基対を作製することができる場合、その位置は非相補的であるとは見なされず、代わりに相補的であると見なされる。
【０００７】
ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は周知であり、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ（１９８９）、特に同文献中の第１１章及び表１１．１、ならびにＳａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ，Ｗ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ（２００１）に例示される。温度及びイオン強度の条件は、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。
【０００８】
ハイブリダイゼーションは、２つの核酸が相補的配列を含有することを必要とするが、塩基間のミスマッチは可能である。２つの核酸間のハイブリダイゼーションに適切な条件は、核酸の長さ及び相補性の程度に依存し、可変要素が当該技術分野で周知である。２つのヌクレオチド配列間の相補性の程度が大きいほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッドに対する融解温度（Ｔｍ）の値は大きい。短いストレッチの相補性（例えば、３５以下、３０以下、２５以下、２２以下、２０以下、または１８以下のヌクレオチドにわたる相補性）を有する核酸間のハイブリダイゼーションの場合、ミスマッチの位置が重要になり得る（Ｓａｍｂｒｏｏｋら（上記）１１．７－１１．８を参照されたい）。典型的に

は、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは、８ヌクレオチド以上（例えば、１０ヌクレオチド以上、１２ヌクレオチド以上、１５ヌクレオチド以上、２０ヌクレオチド以上、２２ヌクレオチド以上、２５ヌクレオチド以上、または３０ヌクレオチド以上）である。温度、洗浄溶液塩濃度、及び他の条件は、相補性の領域の長さ及び相補性の程度等の要因により、必要に応じて調整され得る。

【０００９】

ポリヌクレオチドの配列は、特異的にハイブリダイズ可能またはハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸の配列に１００％相補的である必要はないことが理解される。さらに、ポリヌクレオチドは、介在または隣接セグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないように、１つ以上のセグメントにわたってハイブリダイズしてもよい（例えば、バルジ、ループ構造、またはヘアピン構造等）。ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドがハイブリダイズする標的核酸配列内の標的領域に対して６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列相補性を含み得る。例えば、アンチセンス化合物の２０個のヌクレオチドのうち１８個が標的領域に相補的であり、したがって特異的にハイブリダイズする、アンチセンス核酸は、９０％の相補性を表す。この例において、残りの非相補的ヌクレオチドは、クラスター化されても、または相補的ヌクレオチドが散在していてもよく、互いにまたは相補的ヌクレオチドと連続している必要はない。核酸内の核酸配列の特定のストレッチ間の相補性パーセントは、任意の簡便な方法を使用して決定することができる。例となる方法には、ＢＬＡＳＴプログラム（ベーシックローカルアライメントサーチツール（ｂａｓｉｃ　ｌｏｃａｌ　ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　ｓｅａｒｃｈ　ｔｏｏｌｓ））及びＰｏｗｅｒＢＬＡＳＴプログラム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９９０，２１５，４０３－４１０、Ｚｈａｎｇ　ａｎｄ　Ｍａｄｄｅｎ，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．，１９９７，７，６４９－６５６）、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム（Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．，１９８１，２，４８２－４８９）を使用する、例えば、デフォルト設定を使用した、Ｇａｐプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｐａｃｋａｇｅ、Ｕｎｉｘ用、バージョン８、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｐａｒｋ，Ｍａｄｉｓｏｎ　Ｗｉｓ）等が含まれる。

【００１０】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指し、これは、コードされたアミノ酸及び非コードのアミノ酸、化学的もしくは生化学的に改変された、または誘導体化されたアミノ酸、ならびに改変されたペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る。

【００１１】

本明細書で使用される場合、「結合」（例えば、ポリペプチドのＲＮＡ結合ドメイン、標的核酸への結合等に関して）は、巨大分子間（例えば、タンパク質と核酸との間、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド／ガイドＲＮＡ複合体と標的核酸との間等）の非共有結合性の相互作用を指す。非共有結合性の相互作用の状態にある間、巨大分子は、「会合している」または「相互作用している」または「結合している」と言われる（例えば、分子Ｘが分子Ｙと相互作用すると言われる場合、分子Ｘが分子Ｙに非共有結合性の様態で結合することを意味する）。結合相互作用の全ての構成要素が配列特異的（例えば、ＤＮＡ骨格中のリン酸残基との接触）である必要はないが、結合相互作用のいくつかの部分は、配列特異的であり得る。結合相互作用は、一般に、10^{-6}Ｍ未満、10^{-7}Ｍ未満、10^{-8}Ｍ未満、10^{-9}Ｍ未満、10^{-10}Ｍ未満、10^{-11}Ｍ未満、10^{-12}Ｍ未満、10^{-13}Ｍ未満、10^{-14}Ｍ未満、または10^{-15}未満Ｍの解離定数（K_D）によって特徴付けられる。「親和性」は、結合の強度を指し、結合親和性の増加が、より低いK_Dと相関する。

【００１２】

「結合ドメイン」とは、別の分子に非共有結合性で結合することができるタンパク質ド

メインを意味する。結合ドメインは、例えば、ＤＮＡ分子（ＤＮＡ結合ドメイン）、ＲＮＡ分子（ＲＮＡ結合ドメイン）、及び／またはタンパク質分子（タンパク質結合ドメイン）に結合することができる。タンパク質結合ドメインを有するタンパク質の場合、タンパク質は、場合によっては、それ自体に結合することができ（ホモ二量体、ホモ三量体等を形成するため）、及び／またはタンパク質は、異なるタンパク質（単数または複数）の１つ以上の領域に結合することができる。

【００１３】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、類似した側鎖を有するアミノ酸残基のタンパク質における互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンからなり、脂肪族－ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリン及びスレオニンからなり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギン及びグルタミンからなり、芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンからなり、塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンからなり、酸性側鎖を有するアミノ酸の群は、グルタメート及びアスパルテートからなり、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システイン及びメチオニンからなる。例示的な保存的アミノ酸置換基は、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン－グリシン、及びアスパラギン－グルタミンである。

【００１４】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対してある特定の「配列同一性」パーセントを有し、整列したときに、塩基またはアミノ酸のパーセンテージが、それら２つの配列を比較したときに同一であり、同じ相対位置にあることを意味する。配列同一性はいくつかの異なる方法で決定することができる。配列同一性を決定するために、配列は、ワールドワイドウェブ上でｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ，ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｔｃｏｆｆｅｅ／，ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｍｕｓｃｌｅ／，ｍａｆｆｔ．ｃｂｒｃ．ｊｐ／ａｌｉｇｎｍｅｎｔ／ｓｏｆｔｗａｒｅ／を含むサイトにて利用可能な、様々な簡便な方法及びコンピュータプログラム（例えば、ＢＬＡＳＴ、Ｔ－ＣＯＦＦＥＥ、ＭＵＳＣＬＥ、ＭＡＦＦＴ等）を使用して整列することができる。例えば、Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｉ．２１５：４０３－１０を参照されたい。

【００１５】

特定のＲＮＡを「コードする」ＤＮＡ配列は、ＲＮＡに転写されるＤＮＡヌクレオチド配列である。ＤＮＡポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されるＲＮＡ（ｍＲＮＡ）をコードし得る（したがって、ＤＮＡ及びｍＲＮＡの両方がタンパク質をコードする）か、またはＤＮＡポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されないＲＮＡ（例えば、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、「非コード」ＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、ガイドＲＮＡ等）をコードし得る。

【００１６】

「タンパク質コード配列」または特定のタンパク質もしくはポリペプチドをコードする配列は、適切な調節配列の制御下に置かれると、インビトロまたはインビボでｍＲＮＡ（ＤＮＡの場合）に転写され、ポリペプチドに翻訳される（ｍＲＮＡの場合）ヌクレオチド配列である。

【００１７】

本明細書で互換的に使用される「ＤＮＡ調節配列」、「制御エレメント」、及び「調節エレメント」という用語は、非コード配列（例えば、ガイドＲＮＡ）またはコード配列（例えば、ＲＮＡ誘導エンドヌクレアーゼ、ＧｅｏＣａｓ９ポリペプチド、ＧｅｏＣａｓ９融合ポリペプチド等）の転写を提供及び／または調節する、及び／またはコードされたポリペプチドの翻訳を調節する、転写及び翻訳制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナル等を指す。

【００１８】
本明細書で使用される場合、「プロモーター」または「プロモーター配列」は、ＲＮＡポリメラーゼに結合し、下流（３’方向）のコードまたは非コード配列の転写を開始することができるＤＮＡ調節領域である。本開示の目的において、プロモーター配列は、３’末端で転写開始部位により境界を定められ、バックグラウンドを上回る検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含むように上流（５’方向）に延びる。プロモーター配列内には、転写開始部位、ならびにＲＮＡポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメインが見出される。真核生物プロモーターは、多くの場合、「ＴＡＴＡ」ボックス及び「ＣＡＴ」ボックスを含有するが、必ずしもそうではない。誘導性プロモーターを含む様々なプロモーターを使用して、本開示の様々なベクターによって発現を駆動してもよい。
【００１９】
本明細書で使用される場合、「天然型」または「未改変」または「野生型」という用語は、核酸、ポリペプチド、細胞、または生物に適用される場合、天然に見出される核酸、ポリペプチド、細胞、または生物を指す。例えば、自然界の供給源から単離され得る生物中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然型である。
【００２０】
本明細書で使用される場合、「融合」という用語は、核酸またはポリペプチドに適用される場合、異なる供給源に由来する構造によって定義される２つの構成要素を指す。例えば、「融合」が融合ポリペプチド（例えば、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）の関連で使用される場合、融合ポリペプチドは、異なるポリペプチドに由来するアミノ酸配列を含む。融合ポリペプチドは、改変または天然型ポリペプチド配列（例えば、改変または未改変Ｃａｓ１２Ｌタンパク質からの第１のアミノ酸配列、ならびにＣａｓ１２Ｌタンパク質以外の改変または未改変タンパク質からの第２のアミノ酸配列等）のいずれかを含み得る。同様に、融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの関連における「融合」は、異なるコード領域（例えば、改変または未改変Ｃａｓ１２Ｌタンパク質をコードする第１のヌクレオチド配列、及びＣａｓ１２Ｌタンパク質以外のポリペプチドをコードする第２のヌクレオチド配列）に由来するヌクレオチド配列を含む。
【００２１】
「融合ポリペプチド」という用語は、通常、ヒトの介入を通して、アミノ酸配列の２つの、さもなければ分離したセグメントの組み合わせ（すなわち、「融合」）によって作製されるポリペプチドを指す。
【００２２】
本明細書で使用される場合、「異種」は、それぞれ、天然の核酸またはタンパク質に見出されないヌクレオチドまたはポリペプチド配列を意味する。例えば、場合によっては、本開示のバリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質において、天然型Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（またはそのバリアント）の一部分は、異種ポリペプチド（すなわち、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド以外のタンパク質からのアミノ酸配列、または別の生物からのアミノ酸配列）に融合され得る。別の例として、融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、異種ポリペプチド、すなわちＣａｓ１２Ｌポリペプチド以外のタンパク質からのポリペプチド、または別の生物からのポリペプチドと融合された天然型Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（またはそのバリアント）の全てまたは一部分を含み得る。異種ポリペプチドは、バリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質または融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質によっても示される（例えば、ビオチンリガーゼ活性、核局在化等）活性（例えば、酵素活性）を示し得る。異種核酸配列は、天然型核酸配列（またはそのバリアント）と連結されて（例えば、遺伝子操作によって）、融合ポリペプチド（融合タンパク質）をコードするヌクレオチド配列を作製し得る。
【００２３】
本明細書で使用される場合、「組み換え」は、特定の核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）が、自然体系に見出される内因性核酸から区別可能な構造的コードまたは非コード配列を有する構築物をもたらすクローニング、制限、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、及び／また

はライゲーションステップの様々な組み合わせの生成物であることを意味する。ポリペプチドをコードするＤＮＡ配列は、ｃＤＮＡ断片から、または一連の合成オリゴヌクレオチドから組み立てられて、細胞または無細胞転写及び翻訳システムに含まれる組み換え転写単位から発現が可能である合成核酸を提供することができる。関連配列を含むゲノムＤＮＡもまた、組み換え遺伝子または転写単位の形成において使用することができる。非翻訳ＤＮＡの配列は、そのような配列がコード領域の操作または発現に干渉しない、オープンリーディングフレームから５’または３’側に存在してもよく、実際、様々な機序による所望の生成物の生成を調節するように作用してもよい（「ＤＮＡ調節配列」を参照されたい）。代替として、翻訳されないＲＮＡ（例えば、ガイドＲＮＡ）をコードするＤＮＡ配列も、組み換えと見なされ得る。したがって、例えば、「組み換え」核酸という用語は、天然型ではない、例えば、ヒトの介入を通して、配列の２つの、さもなければ分離したセグメントの人工的な組み合わせによって作製されるものを指す。この人工的な組み合わせは、多くの場合、化学合成手段、または核酸の単離されたセグメントの人工的な操作、例えば、遺伝子操作技法のいずれかによって達成される。そのようなものは、通常、コドンを、同じアミノ酸、保存的アミノ酸、または非保存的アミノ酸をコードするコドンと置換するために行われる。代替として、それは、機能の所望の組み合わせを作製するために、所望の機能の核酸セグメントを一緒につなげるために実施される。この人工的な組み合わせは、多くの場合、化学合成手段、または核酸の単離されたセグメントの人工的な操作、例えば、遺伝子操作技法のいずれかによって達成される。組み換えポリヌクレオチドがポリペプチドをコードするとき、コードされたポリペプチドの配列は、天然型（「野生型」）であり得るか、または天然型配列のバリアント（例えば、変異体）であり得る。そのような実例の一例は、タンパク質が天然に見出されない細胞（例えば、真核細胞）中のタンパク質の発現（例えば、真核細胞中のＣａｓ１２Ｌ（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌ、バリアントＣａｓ１２Ｌ、融合Ｃａｓ１２Ｌ等）等のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドの発現）のために、ＤＮＡ配列がコドン最適化される、野生型タンパク質をコードするＤＮＡ（組み換え）である。したがって、コドン最適化ＤＮＡは、組み換えで及び非天然型であり得る一方で、そのＤＮＡによってコードされるタンパク質は、野生型アミノ酸配列を有し得る。

【００２４】

したがって、「組み換え」ポリペプチドという用語は、アミノ酸配列が天然に存在しないポリペプチドを必ずしも指すものではない。代わりに、「組み換え」ポリペプチドは、組み換えの非天然型ＤＮＡ配列によってコードされるが、ポリペプチドのアミノ酸配列は、天然型（「野生型」）または非天然型（例えば、バリアント、変異体等）であり得る。したがって、「組み換え」ポリペプチドは、ヒトの介入の結果であるが、天然型アミノ酸配列を有し得る。

【００２５】

「ベクター」または「発現ベクター」は、別のＤＮＡセグメント、すなわち「挿入物」が、細胞中で結合したセグメントの複製をもたらすように結合され得るプラスミド、ファージ、ウイルス、人工染色体、またはコスミド等のレプリコンである。

【００２６】

「発現カセット」は、プロモーターに作動可能に連結されているＤＮＡコード配列を含む。「作動可能に連結されている」は、そのように説明される構成要素がそれらの意図される様態で機能することを可能する関係にある、並置を指す。例えば、プロモーターは、プロモーターがその転写または発現に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結されている（またはコード配列は、プロモーターに作動可能に連結されているとも言われ得る）。

【００２７】

「組み換え発現ベクター」または「ＤＮＡ構築物」という用語は、本明細書で互換的に使用され、ベクター及び挿入物を含むＤＮＡ分子を指す。組み換え発現ベクターは、通常、挿入物（複数可）を発現及び／または増殖させる目的、または他の組み換えヌクレオチ

ド配列の構築のために作製される。挿入物（複数可）は、プロモーター配列に作動可能に連結されている場合も、そうでない場合もあり、ＤＮＡ調節配列に作動可能に連結されている場合も、そうでない場合もある。

【００２８】

外因性ＤＮＡまたは外因性ＲＮＡ、例えば、組み換え発現ベクターによって、そのようなＤＮＡが細胞の内部に導入された場合、細胞は「遺伝子改変されている」または「形質転換されている」または「形質移入されている」。外因性ＤＮＡの存在により、永続的または一過性の遺伝的変化がもたらされる。形質転換ＤＮＡは、細胞のゲノムに組み込まれる（共有結合している）場合も、そうでない場合もある。例えば、原核生物、酵母、及び哺乳類細胞において、形質転換ＤＮＡは、プラスミド等のエピソームエレメント上に維持され得る。真核細胞に関して、安定に形質転換された細胞は、形質転換ＤＮＡが染色体複製を通して娘細胞に遺伝するように染色体に組み込まれた細胞である。この安定性は、真核細胞が、形質転換ＤＮＡを含有する娘細胞の集団を含む細胞株またはクローンを樹立する能力によって示される。「クローン」は、有糸分裂によって単一の細胞または共通の祖先から誘導された細胞の集団である。「細胞株」は、多くの世代にわたってインビトロで安定して増殖することができる初代細胞のクローンである。

【００２９】

遺伝子改変の好適な方法（「形質転換」とも称される）としては、例えば、ウイルスまたはバクテリオファージ感染、形質移入、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）媒介型形質移入、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介型形質移入、リポソーム媒介型形質移入、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈降、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介型核酸送達（例えば、Ｐａｎｙａｍ ｅｔ ａｌ．Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．２０１２ Ｓｅｐ １３．ｐｉｉ：Ｓ０１６９－４０９Ｘ（１２）００２８３－９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ａｄｄｒ．２０１２．０９．０２３を参照されたい）等が挙げられる。

【００３０】

遺伝子改変方法の選択は、一般に、形質転換されている細胞の種類、及び形質転換が起こっている状況（例えば、インビトロ、エクスビボ、またはインビボ）に依存する。これらの方法の一般的な考察は、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，３ｒｄ ｅｄ．，Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，１９９５に見出すことができる。

【００３１】

本明細書で使用される場合、「標的核酸」は、ＲＮＡ誘導エンドヌクレアーゼポリペプチド（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌ、バリアントＣａｓ１２Ｌ、融合Ｃａｓ１２Ｌ等）によって標的とされる部位（「標的部位」または「標的配列」）を含むポリヌクレオチド（例えば、ゲノムＤＮＡ等のＤＮＡ）である。標的配列は、対象のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡのガイド配列（例えば、二重Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡまたは単一分子Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ）がハイブリダイズする配列である。例えば、標的核酸内の標的部位（または標的配列）５’－ＧＡＧＣＡＵＡＵＣ－３’は、配列５’－ＧＡＵＡＵＧＣＵＣ－３’によって標的とされる（またはそれによって結合される、もしくはそれとハイブリダイズする、またはそれに相補的である）。好適なハイブリダイゼーション条件は、細胞中に通常存在する生理学的条件を含む。二本鎖標的核酸に関して、ガイドＲＮＡに相補的であり、かつそれとハイブリダイズする標的核酸の鎖は、「相補鎖」または「標的鎖」と称され、一方、「標的鎖」に相補的である（したがって、ガイドＲＮＡに相補的ではない）標的核酸の鎖は、「非標的鎖」または「非相補鎖」と称される。

【００３２】

「切断」とは、標的核酸分子（例えば、ＲＮＡ、ＤＮＡ）の共有結合骨格の切断を意味する。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を含むが、これらに限定されない様々な方法によって開始することができる。一本鎖切断及び二本鎖切断の両

方が可能であり、二本鎖切断は、２つの異なる一本鎖切断事象の結果として生じ得る。
【００３３】
「ヌクレアーゼ」及び「エンドヌクレアーゼ」は、本明細書において、核酸切断のための触媒活性（例えば、リボヌクレアーゼ活性（リボ核酸切断）、デオキシリボヌクレアーゼ活性（デオキシリボ核酸切断）等）を有する酵素を意味するように互換的に使用される。
【００３４】
ヌクレアーゼの「切断ドメイン」または「活性ドメイン」または「ヌクレアーゼドメイン」とは、核酸切断のための触媒活性を有するヌクレアーゼ内のポリペプチド配列またはドメインを意味する。切断ドメインは単一のポリペプチド鎖に含有され得るか、または切断活性は２つ（以上）のポリペプチドの会合から生じ得る。単一のヌクレアーゼドメインは、所与のポリペプチド内の１つよりも多くの単離されたアミノ酸のストレッチからなり得る。
【００３５】
「幹細胞」という用語は、本明細書において、自己複製する能力及び分化した細胞型を生じさせる能力の両方を有する細胞（例えば、植物幹細胞、脊椎動物幹細胞）を指すように使用される（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｃｅｌｌ　８８：２８７－２９８を参照されたい）。細胞発生の関連において、「分化した」または「分化する」という形容詞は相対用語である。「分化細胞」は、それが比較されている細胞よりも発生経路のさらに前方に進行した細胞である。したがって、多能性幹細胞（以下に記載）は、系統制限された前駆細胞（例えば、中胚葉幹細胞）に分化することができ、これが今度は、さらに制限された細胞（例えば、ニューロン前駆細胞）に分化することができ、これが末期細胞（すなわち、最終分化細胞、例えば、ニューロン、心筋細胞等）に分化することができ、これらは、ある特定の組織型において特徴的な役割を果たし、さらに増殖する能力を保持する場合も、保持しない場合もある。幹細胞は、特異的マーカー（例えば、タンパク質、ＲＮＡ等）の存在及び特異的マーカーの不在の両方によって特徴付けられ得る。幹細胞はまた、インビトロ及びインビボの両方の機能アッセイ、特に、複数の分化子孫を生じさせる幹細胞の能力に関するアッセイによって特定されてもよい。
【００３６】
関心対象の幹細胞には、多能性幹細胞（ＰＳＣ）が含まれる。「多能性幹細胞」または「ＰＳＣ」という用語は、本明細書において、生物の全ての細胞型を生み出すことができる幹細胞を意味するように使用される。したがって、ＰＳＣは、生物の全ての生殖層（例えば、脊椎動物の内胚葉、中胚葉、及び外胚葉）の細胞を生じさせ得る。多能性細胞は、奇形腫を形成し、生存生物における外胚葉、中胚葉、または内胚葉組織に寄与することができる。植物の多能性幹細胞は、植物の全ての細胞型（例えば、根、幹、葉等の細胞）を生じさせることができる。
【００３７】
動物のＰＳＣはいくつかの異なる方法で誘導することができる。例えば、胚性幹細胞（ＥＳＣ）は、胚の内部細胞塊から誘導されるが（Ｔｈｏｍｓｏｎ　ｅｔ．ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ．１９９８　Ｎｏｖ　６；２８２（５３９１）：１１４５－７）、一方で、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は、体細胞から誘導される（Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２００７　Ｎｏｖ　３０；１３１（５）：８６１－７２、Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｐｒｏｔｏｃ．２００７；２（１２）：３０８１－９、Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００７　Ｄｅｃ　２１；３１８（５８５８）：１９１７－２０．Ｅｐｕｂ　２００７　Ｎｏｖ　２０）。ＰＳＣという用語は、それらの誘導を問わず多能性幹細胞を指すため、ＰＳＣという用語は、ＥＳＣ及びｉＰＳＣという用語、ならびにＰＳＣの別の例である胚性生殖幹細胞（ＥＧＳＣ）という用語を包含する。ＰＳＣは、樹立された細胞株の形態であってもよく、それらは、一次胚組織から直接得られてもよいし、またはそれらは体細胞から誘導されてもよい。ＰＳＣは、本明細書に記載の方法の標的細胞であり得る。

【００３８】
「胚性幹細胞」（ＥＳＣ）とは、胚、典型的には胚盤胞の内部細胞塊から単離されたＰＳＣを意味する。ＥＳＣ株は、ＮＩＨ Ｈｕｍａｎ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｇｉｓｔｒｙ、例えば、ｈＥＳＢＧＮ－０１、ｈＥＳＢＧＮ－０２、ｈＥＳＢＧＮ－０３、ｈＥＳＢＧＮ－０４（ＢｒｅｓａＧｅｎ，Ｉｎｃ．）、ＨＥＳ－１、ＨＥＳ－２、ＨＥＳ－３、ＨＥＳ－４、ＨＥＳ－５、ＨＥＳ－６（ＥＳ Ｃｅｌｌ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）、Ｍｉｚ－ｈＥＳ１（ＭｉｚＭｅｄｉ Ｈｏｓｐｉｔａｌ－Ｓｅｏｕｌ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）、ＨＳＦ－１、ＨＳＦ－６（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ａｔ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）、及びＨ１、Ｈ７、Ｈ９、Ｈ１３、Ｈ１４（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ａｌｕｍｎｉ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ（ＷｉＣｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ））にリストされている。関心対象の幹細胞は、アカゲザル幹細胞及びマーモセット幹細胞等の他の霊長類からの胚性幹細胞も含む。幹細胞は、任意の哺乳類種、例えば、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、齧歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスター、霊長類等から得られてもよい（Ｔｈｏｍｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８２：１１４５、Ｔｈｏｍｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９２：７８４４、Ｔｈｏｍｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．５５：２５４、Ｓｈａｍｂｌｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：１３７２６，１９９８）。培養では、ＥＳＣは、典型的には、大きな核細胞質比、定義された境界、及び顕著な核小体を有する平坦なコロニーとして増殖する。加えて、ＥＳＣは、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、及びアルカリホスファターゼを発現するが、ＳＳＥＡ－１は発現しない。ＥＳＣを生成し、特性評価する方法の例は、例えば、米国特許第７，０２９，９１３号、米国特許第５，８４３，７８０号、及び米国特許第６，２００，８０６号に見出され得、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。未分化形態でｈＥＳＣを増殖させる方法は、ＷＯ９９／２０７４１、ＷＯ０１／５１６１６、及びＷＯ０３／０２０９２０に記載される。

【００３９】
「胚性生殖幹細胞」（ＥＧＳＣ）または「胚性生殖細胞」または「ＥＧ細胞」とは、生殖細胞及び／または生殖細胞前駆細胞、例えば、原始生殖細胞、すなわち、精子及び卵となる細胞から誘導されるＰＳＣを意味する。胚性生殖細胞（ＥＧ細胞）は、上述のように、胚性幹細胞に類似した特性を有すると考えられる。ＥＧ細胞を生成し、特性評価する方法の例は、例えば、米国特許第７，１５３，６８４号、Ｍａｔｓｕｉ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．，（１９９２）Ｃｅｌｌ ７０：８４１、Ｓｈａｍｂｌｏｔｔ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９８：１１３、Ｓｈａｍｂｌｏｔｔ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５：１３７２６、及びＫｏｓｈｉｍｉｚｕ，Ｕ．，ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，１２２：１２３５に見出され得、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００４０】
「誘導多能性幹細胞」または「ｉＰＳＣ」とは、ＰＳＣではない細胞から（すなわち、ＰＳＣと比べて分化した細胞から）誘導されるＰＳＣを意味する。ｉＰＳＣは、最終分化細胞を含む、複数の異なる細胞型から誘導され得る。ｉＰＳＣは、ＥＳ細胞様の形態を有し、大きな核細胞質比、明確な境界、及び顕著な核小体を有する平坦なコロニーとして増殖する。加えて、ｉＰＳＣは、アルカリホスファターゼ、ＳＳＥＡ３、ＳＳＥＡ４、Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ３／４、Ｎａｎｏｇ、ＴＲＡ１６０、ＴＲＡ１８１、ＴＤＧＦ１、Ｄｎｍｔ３ｂ、ＦｏｘＤ３、ＧＤＦ３、Ｃｙｐ２６ａ１、ＴＥＲＴ、及びｚｆｐ４２を含むがこれらに限定されない、当業者に既知の１つ以上の主要な多能性マーカーを発現する。ｉＰＳＣを生成し、特性評価する方法の例は、例えば、米国特許公開第ＵＳ２００９００４７２６３号、同第ＵＳ２００９００６８７４２号、同第ＵＳ２００９０１９１１５９号、同第

ＵＳ２００９０２２７０３２号、同第ＵＳ２００９０２４６８７５号、及び同第ＵＳ２００９０３０４６４６号に見出され得、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。一般に、ｉＰＳＣを作製するために、体細胞には、体細胞が多能性幹細胞になるように再プログラムするために当該技術分野で既知のリプログラミング因子（例えば、Ｏｃｔ４、ＳＯＸ２、ＫＬＦ４、ＭＹＣ、Ｎａｎｏｇ、Ｌｉｎ２８等）が提供される。

【００４１】

「体細胞」とは、実験的操作の不在下では、生物において全ての細胞型を通常は生じさせない、生物における任意の細胞を意味する。換言すれば、体細胞は、体の３つ全ての生殖層、すなわち、外胚葉、中胚葉、及び内胚葉の細胞を天然で生じさせないように十分に分化した細胞である。例えば、体細胞は、ニューロン及び神経前駆体の両方を含み、後者は、中枢神経系の全てまたはいくつかの細胞型を自然に生じさせることが可能であり得るが、中胚葉または内胚葉系統の細胞を生じさせることはできない。

【００４２】

「有糸分裂細胞」とは、有糸分裂を経ている細胞を意味する。有糸分裂は、真核細胞がその核内の染色体を、２つの別個の核内の２つの同一のセットに分離するプロセスである。一般に、この直後に細胞質分裂が続き、これにより、核、細胞質、細胞小器官、及び細胞膜が、これらの細胞構成要素のほぼ等分を含有する２つの細胞に分割される。

【００４３】

「有糸分裂後細胞」とは、有糸分裂から脱出した細胞を意味し、すなわち、それは「静止している」、すなわち、それは分裂をもはや経ていない。この静止状態は、一時的、すなわち、可逆であり得るか、または永続的であり得る。

【００４４】

「減数分裂細胞」とは、減数分裂を経ている細胞を意味する。減数分裂は、細胞が配偶子または胞子を生み出す目的でその核物質を分割するプロセスである。有糸分裂とは異なり、減数分裂では、染色体は、染色体間で遺伝物質をシャッフルする組み換えステップを経る。加えて、減数分裂の結果は、有糸分裂から生み出される２つの（遺伝学的に同一の）二倍体細胞と比較して、４つの（遺伝学的に固有の）一倍体細胞である。

【００４５】

場合によっては、構成要素（例えば、核酸構成要素（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ）、タンパク質構成要素（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、バリアントＣａｓ１２Ｌポリペプチド、融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド等）は、標識部分を含む。本明細書で使用される場合、「標識」、「検出可能な標識」、または「標識部分」という用語は、シグナル検出を提供する任意の部分を指し、アッセイの特定の性質に応じて大幅に異なり得る。関心対象の標識部分には、直接検出可能な標識（直接標識；例えば、蛍光標識）及び間接的に検出可能な標識（間接標識；例えば、結合対メンバー）の両方が含まれる。蛍光標識は、任意の蛍光標識（例えば、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、ＡＬＥＸＡＦＬＵＯＲ（登録商標）標識等）、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、高感度ＧＦＰ（ＥＧＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、チェリー、トマト、タンジェリン、及びそれらの任意の蛍光誘導体）等）であり得る。本方法で使用するのに好適な検出可能な（直接的または間接的）標識部分には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的、または他の手段によって検出可能な任意の部分が含まれる。例えば、好適な間接標識には、ビオチン（結合対メンバー）が含まれ、これはストレプトアビジン（それ自体が直接的または間接的に標識され得る）によって結合され得る。標識にはまた、放射標識（直接標識）（例えば、^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、または^{32}Ｐ）、酵素（間接標識）（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、グルコースオキシダーゼ等）、蛍光タンパク質（直接標識）（例えば、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、及びこれらの任意の簡便な誘導体）、金属標識（直接標識）、比色標識、結合対メンバー等も含まれ得る。「結合対のパートナー」または「結合対メンバー」と

は、第１の部分及び第２の部分のうちの一方を意味し、ここで、第１の部分及び第２の部分は、互いに特異的結合親和性を有する。好適な結合対には、抗原／抗体（例えば、ジゴキシゲニン／抗ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル（ＤＮＰ）／抗ＤＮＰ、ダンシル－Ｘ－抗ダンシル、フルオレセイン／抗フルオレセイン、ルシファーイエロー／抗ルシファーイエロー、及びローダミン抗ローダミン）、ビオチン／アビジン（またはビオチン／ストレプトアビジン）、及びカルモジュリン結合タンパク質（ＣＢＰ）／カルモジュリンが含まれるが、これらに限定されない。任意の結合対メンバーが、間接的に検出可能な標識部分としての使用に好適であり得る。

【００４６】

任意の所与の構成要素、または構成要素の組み合わせは、非標識であり得るか、または標識部分で検出可能に標識され得る。場合によっては、２つ以上の構成要素が標識される場合、それらは、互いに区別可能な標識部分で標識され得る。

【００４７】

分子及び細胞生化学における一般的方法は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ Ｅｄ．（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，ＨａＲＢｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ ２００１）、Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，４ｔｈ Ｅｄ．（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ １９９９）、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ（Ｂｏｌｌａｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ １９９６）、Ｎｏｎｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９９）、Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ（Ｋａｐｌｉｆｔ ＆ Ｌｏｅｗｙ ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９５）、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍａｎｕａｌ（Ｉ．Ｌｅｆｋｏｖｉｔｓ ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９７）、及びＣｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｄｏｙｌｅ ＆ Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ １９９８）等の標準的教本に見出すことができ、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００４８】

本明細書で使用される場合、「治療」、「治療する」等の用語は、所望の薬理学的及び／または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に予防するという観点において予防的であり得、及び／または疾患及び／またはその疾患に起因する副作用の部分的もしくは完全な治癒という観点において治療的であり得る。本明細書で使用される場合、「治療」は、哺乳動物、例えば、ヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、（ａ）その疾患の素因があり得るが、まだそれを有すると診断されていない対象において疾患の発症を予防すること、（ｂ）その疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること、及び（ｃ）その疾患を軽減すること、すなわち、その疾患の退行を引き起こすことを含む。

【００４９】

本明細書で互換的に使用される「個体」、「対象」、「宿主」、及び「患者」という用語は、個々の生物、例えば、マウス、サル、ヒト、非ヒト霊長類、有蹄類、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、哺乳類の家畜動物、哺乳類の競技用動物、及び哺乳類の愛玩動物を含むがこれらに限定されない、哺乳動物を指す。

【００５０】

本発明をさらに説明する前に、本発明が、記載される特定の実施形態に限定されず、したがって、当然ながら、様々であり得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明する目的のものにすぎず、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定するものとして意図されないことも理解されたい。

【００５１】

値の範囲が提供される場合、関連が別途明確に指示しない限り、下限値の単位の１０分の１までの、その範囲の上限値と下限値との間の各介在値、ならびにその記載の範囲の任意の他の記載の値または介在値が本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値が、独立して、そのより小さい範囲内に含まれてもよく、また、記載の範囲内の任意の具体的に除外された限界値を条件として、本発明に包含される。記載の範囲がそれらの限界値のうちの一方または両方を含む場合、それらの包含される限界値のうちのいずれかまたは両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。

【００５２】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載の方法及び材料と類似もしくは同等の任意の方法及び材料もまた本発明の実践または試験において使用することができるが、好ましい方法及び材料がこれより説明される。本明細書で言及される全ての刊行物は、それらの刊行物が引用される関連となる方法及び／または材料を開示及び説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。

【００５３】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、関連が別途明らかに規定しない限り、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その（ｔｈｅ）」は複数形の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「Ｃａｓ１２ＬＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチド」への言及は、複数のそのようなポリペプチドを含み、「ガイドＲＮＡ」への言及は、１つ以上のガイドＲＮＡ及び当業者に既知のそれらの均等物への言及を含み、その他も同様である。特許請求の範囲があらゆる任意選択的な要素を除外するように作成され得ることにさらに留意する。したがって、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連した「単に」、「のみ」等の排他的な専門用語の使用、または「否定的な」制限の使用のための先行詞として機能することが意図される。

【００５４】

明確化のために別個の実施形態の関連において記載される本発明のある特定の特徴が、単一の実施形態において組み合わせで提供され得ることが理解される。逆に、簡潔にするために単一の実施形態の関連において記載される本発明の様々な特徴がまた、別個にまたは任意の好適な部分的組み合わせで提供され得る。本発明に関連する実施形態の全ての組み合わせは、ありとあらゆる組み合わせが個別にかつ明示的に開示されたかのように、本発明によって明確に包含され、本明細書に開示される。さらに、様々な実施形態及びそれらの要素の全ての部分的組み合わせもまた、ありとあらゆるそのような部分的組み合わせが個別にかつ明示的に本明細書に開示されたかのように、本発明によって明確に包含され、本明細書に開示される。

【００５５】

本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示のために提供されるにすぎない。本明細書におけるいずれの内容も、本発明が先行発明によるそのような刊行物に先行する資格がないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、独立して確認される必要があり得る。

【００５６】

詳細な説明

本開示は、ＲＮＡ誘導ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（本明細書で「Ｃａｓ１２Ｌ」ポリペプチド、「Ｃａｓラムダ」ポリペプチド、または「Ｃａｓλ」ポリペプチドと称される）、それをコードする核酸、及びそれを含む組成物を提供する。本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、ガイドＲＮＡとを含む、リボ核タンパク質複合体を提供する。本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及びガイドＲＮＡを使用して、標的核酸を修飾する方法を提供する。

【００５７】

本開示は、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質に結合し、それに配列特異性を提供するガイドＲＮＡ（本明細書で「Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ」または「Ｃａｓラムダガイド ＲＮＡ」または「Ｃａｓλガイド ＲＮＡ」と称される）、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする核酸、ならびにＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及び／またはそれをコードする核酸を含む改変された宿主細胞を提供する。Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、提供される様々な用途において有用である。

【００５８】

組成物

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ１２Ｌタンパク質及びガイドＲＮＡ

Ｃａｓ１２Ｌ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクターポリペプチド（例えば、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、対応するガイドＲＮＡ（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ）と相互作用（それに結合）して、ガイドＲＮＡと標的核酸分子内の標的配列との間の塩基対合を介して標的核酸（例えば、標的ＤＮＡ）中の特定の部位を標的とする、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成する。ガイドＲＮＡは、標的核酸の配列（標的部位）に相補的なヌクレオチド配列（ガイド配列）を含む。したがって、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡと複合体を形成し、ガイドＲＮＡは、ガイド配列を介してＲＮＰ複合体に配列特異性を提供する。この複合体のＣａｓ１２Ｌタンパク質は、部位特異的活性を提供する。換言すれば、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、ガイドＲＮＡとのその会合によって、標的核酸配列（例えば、染色体配列または染色体外配列、例えば、エピソーム配列、ミニサークル配列、ミトコンドリア配列、緑葉体配列等）内の標的部位に誘導される（例えば、標的部位において安定化される）。

【００５９】

本開示は、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（及び／またはＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸）（例えば、ここで、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、天然に存在するタンパク質、ニッカーゼＣａｓ１２Ｌタンパク質、触媒的に不活性（「死活」Ｃａｓ１２Ｌ、本明細書で「ｄＣａｓ１２Ｌタンパク質」とも称される）、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質等であり得る）を含む、組成物を提供する。本開示は、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（及び／または Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸）を含む組成物を提供する。本開示は、（ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（及び／またはＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする核酸）（例えば、ここで、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、天然に存在するタンパク質、ニッカーゼＣａｓ１２Ｌタンパク質、ｄＣａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質等であり得る）と、（ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（及び／またはＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする核酸）とを含む、組成物を提供する。本開示は、（ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、ここで、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、天然に存在するタンパク質、ニッカーゼＣａｓ１２Ｌタンパク質、Ｃｄａｓ１２Ｊタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質等であり得る）と、（ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡとを含む、核酸／タンパク質複合体（ＲＮＰ複合体）を提供する。

【００６０】

Ｃａｓ１２Ｌタンパク質

Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（この用語は、「Ｃａｓ１２Ｌタンパク質」という用語と互換的に使用される）は、標的核酸及び／または標的核酸と会合したポリペプチドに結合し、及び／またはそれを修飾する（例えば、切断する、ニッキングする、メチル化する、脱メチル化する等）ことができる（例えば、ヒストンテールのメチル化またはアセチル化）（例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、活性を有する融合パートナーを含み、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、ヌクレアーゼ活性を提供する）。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、天然型（例えば、バクテリオファージにおいて天然に生じる）タンパク質である。他の場合では、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、天然型ポリペプチドではない（例えば、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、バリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質等である）。

【００６１】
所与のタンパク質がＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡと相互作用するかどうかを決定するためのアッセイは、タンパク質と核酸との間の結合を試験する任意の簡便な結合アッセイであり得る。好適な結合アッセイ（例えば、ゲルシフトアッセイ）は当業者に既知であろう（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及びタンパク質を標的核酸に付加することを含むアッセイ）。タンパク質が活性を有するかどうかを決定するための（例えば、タンパク質が標的核酸を切断するヌクレアーゼ活性及び／またはいくつかの異種活性を有するかどうかを決定するための）アッセイは、任意の簡便なアッセイ（例えば、核酸切断に関して試験する任意の簡便な核酸切断アッセイ）であり得る。好適なアッセイ（例えば、切断アッセイ）は当業者に既知であろう。

【００６２】
天然型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、標的とされた二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）において特異的配列にて二本鎖切断を触媒するエンドヌクレアーゼとして機能する。配列特異性は、標的ＤＮＡ内の標的配列にハイブリダイズする、会合したガイドＲＮＡによって提供される。天然型Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、ｃｒＲＮＡであり、ここで、ｃｒＲＮＡは、（ｉ）標的ＤＮＡ中の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と、（ｉｉ）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質に結合するステム－ループ（ヘアピン－ｄｓＲＮＡ二重鎖）を含むタンパク質結合セグメントとを含む。

【００６３】
いくつかの実施形態では、対象の方法及び／または組成物のＣａｓ１２Ｌタンパク質は、天然型（野生型）タンパク質である（またはそれに由来する）。天然型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質の例は、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される。場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列のうちのいずれか１つと２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのタンパク質は、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるアミノ酸配列を含む。

【００６４】
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるアミノ酸配列に対して、以下、すなわちＣａｓ１２ａタンパク質、Ｃａｓ１２ｂタンパク質、Ｃａｓ１２ｃタンパク質、Ｃａｓ１２ｄタンパク質、Ｃａｓ１２ｅタンパク質、Ｃａｓ１２ｇタンパク質、Ｃａｓ１２ｈタンパク質、及びＣａｓ１２ｉタンパク質のうちのいずれかに対するよりも大きい配列同一性を有する。場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２（例えば、図２に図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列のうちのいずれかのＲｕｖＣドメイン）に図示されるアミノ酸配列のＲｕｖＣドメインに対して、以下、すなわちＣａｓ１２ａタンパク質、Ｃａｓ１２ｂタンパク質、Ｃａｓ１２ｃタンパク質、Ｃａｓ１２ｄタンパク質、Ｃａｓ１２ｅタンパク質、Ｃａｓ１２　ｇタンパク質、Ｃａｓ１２ｈタンパク質、及びＣａｓ１２ｉタンパク質のうちのいずれかのＲｕｖＣドメインに対するよりも大きい配列同一性を有する、ＲｕｖＣドメイン（これはＲｕｖＣ－Ｉ、ＲｕｖＣ－ＩＩ、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインを含む）を有するアミノ酸配列を含む。

【００６５】
図３Ａ～３Ｂは、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される様々なＣａｓ１２Ｌポリペプチドの ＲｕｖＣドメインに存在する活性部位残基の箇所を提供する。例えば、Ｃａｓ１２Ｌ＿１＿２５７９０５５０８（図２Ａ）の活性部位残

基は、アミノ酸残基３３６、５３０、及び６８２である。

【００６６】

図５Ａ～５Ｐは、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される５８個のＣａｓ１２Ｌポリペプチドのアミノ酸配列アライメントを提供する。図５Ａ～５Ｐに示されるように、いくつかのアミノ酸が、５８個のＣａｓ１２Ｌポリペプチドの間で保存されている。例えば、Ｃａｓ１２Ｌ＿１＿２５７９０５５０８（図２Ａ）のアミノ酸の番号付けに基づいて、Ｋ１４、Ｔ１５、Ｅ３７、Ｙ４１、Ｙ４２、Ｎ４３、Ｓ４６、Ｉ４９、Ｉ５７、Ｙ７３、Ｙ８８、Ｆ９１、Ｎ１１９、Ｌ１２１、Ｎ１４０、Ｙ１４１、Ｑ１６９、Ｉ１７１、Ｅ１７３、Ｗ１８５、Ｙ１９１、Ｙ２０５、Ｌ２０９、Ｆ２１２、Ｙ２１３、Ｆ２３５、Ｇ２３６、Ｇ２３７、Ｃ２３８、Ｒ２４０、Ｇ２８１、Ｎ３０９、Ｋ３２４、Ｉ３３５、Ｔ３４６、Ｙ３５７、Ｎ３５９、Ｉ３６０、Ｙ３６１、Ｖ３６４、Ｆ３７０、Ｆ３９１、Ｐ３９３、Ｌ３９４、Ｅ３９５、Ｌ３９９、Ｓ４０１、Ｒ４０２、Ｑ４０６、Ｅ４１７、Ｖ４２３、Ｌ４２４、Ｙ４４２、Ｋ４４８、Ｌ４４９、Ｒ４５０、Ｋ４５４、Ａ４５５、Ｖ４５９、Ｋ４６０、Ｙ４７０、Ｄ４７１、Ｅ４７６、Ｅ４７７、及びＧ５９４が保存されている。したがって、例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、Ｃａｓ１２Ｌ＿１＿２５７９０５５０８（図２Ａ）のアミノ酸の番号付けに基づいて、Ｋ１４、Ｔ１５、Ｅ３７、Ｙ４１、Ｙ４２、Ｎ４３、Ｓ４６、Ｉ４９、Ｉ５７、Ｙ７３、Ｙ８８、Ｆ９１、Ｎ１１９、Ｌ１２１、Ｎ１４０、Ｙ１４１、Ｑ１６９、Ｉ１７１、Ｅ１７３、Ｗ１８５、Ｙ１９１、Ｙ２０５、Ｌ２０９、Ｆ２１２、Ｙ２１３、Ｆ２３５、Ｇ２３６、Ｇ２３７、Ｃ２３８、Ｒ２４０、Ｇ２８１、Ｎ３０９、Ｋ３２４、Ｉ３３５、Ｔ３４６、Ｙ３５７、Ｎ３５９、Ｉ３６０、Ｙ３６１、Ｖ３６４、Ｆ３７０、Ｆ３９１、Ｐ３９３、Ｌ３９４、Ｅ３９５、Ｌ３９９、Ｓ４０１、Ｒ４０２、Ｑ４０６、Ｅ４１７、Ｖ４２３、Ｌ４２４、Ｙ４４２、Ｋ４４８、Ｌ４４９、Ｒ４５０、Ｋ４５４、Ａ４５５、Ｖ４５９、Ｋ４６０、Ｙ４７０、Ｄ４７１、Ｅ４７６、Ｅ４７７、及びＧ５９４のうちの１つ以上、または別のＣａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチド）における対応する位置における同じアミノ酸を含み得、当業者であれば、図５Ａ～５Ｐに提供されるアライメントに基づいて、「対応する位置」が何であるかを理解しよう。Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、Ｃａｓ１２Ｌ＿１＿２５７９０５５０８（図２Ａ）のアミノ酸の番号付けに基づいて、Ｋ１４、Ｔ１５、Ｅ３７、Ｙ４１、Ｙ４２、Ｎ４３、Ｓ４６、Ｉ４９、Ｉ５７、Ｙ７３、Ｙ８８、Ｆ９１、Ｎ１１９、Ｌ１２１、Ｎ１４０、Ｙ１４１、Ｑ１６９、Ｉ１７１、Ｅ１７３、Ｗ１８５、Ｙ１９１、Ｙ２０５、Ｌ２０９、Ｆ２１２、Ｙ２１３、Ｆ２３５、Ｇ２３６、Ｇ２３７、Ｃ２３８、Ｒ２４０、Ｇ２８１、Ｎ３０９、Ｋ３２４、Ｉ３３５、Ｔ３４６、Ｙ３５７、Ｎ３５９、Ｉ３６０、Ｙ３６１、Ｖ３６４、Ｆ３７０、Ｆ３９１、Ｐ３９３、Ｌ３９４、Ｅ３９５、Ｌ３９９、Ｓ４０１、Ｒ４０２、Ｑ４０６、Ｅ４１７、Ｖ４２３、Ｌ４２４、Ｙ４４２、Ｋ４４８、Ｌ４４９、Ｒ４５０、Ｋ４５４、Ａ４５５、Ｖ４５９、Ｋ４６０、Ｙ４７０、Ｄ４７１、Ｅ４７６、Ｅ４７７、及びＧ５９４のうちの１つ以上にて、または別のＣａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌポリペプチド）における対応する位置にて保存的アミノ酸置換を含み得る。

【００６７】

図６Ａ～６Ｃは、Ｃａｓ１２Ｌ＿２＿１９６８４８７５３（図２Ｂ）、Ｃａｓ１２Ｌ＿２９＿２５５２３８２９３（図２ＢＢ；図２ＢＢにおいてＣａｓ１２Ｌ＿２８＿２５５２３８２９３と称される）、Ｃａｓ１２Ｌ＿３８＿７３４７２６２５（図２ＫＫ；図２ＫＫにおいてＣａｓ１２Ｌ＿３７＿７３４７２６２５と称される）、Ｃａｓ１２Ｌ＿４２＿７４４０８２７３＿部分（図２ＮＮ；図２ＮＮにおいてＣａｓ１２Ｌ＿４１＿７４４０８２７３＿部分と称される）、Ｃａｓ１２Ｌ＿５４＿７５２５７１０３＿部分（図２ＰＰ；図２ＰＰにおいてＣａｓ１２Ｌ＿４３＿７５２５７１０３＿部分と称される）、Ｃａｓ１２Ｌ＿５２＿８２９８３３３１（図２ＸＸ；図２ＸＸにおいてＣａｓ１２Ｌ＿５１＿８２９８３３３１と称される）、及びＣａｓ１２Ｌ＿５６＿７７７３８１１７（図２ＢＢＢ；図

２ＢＢＢにおいてＣａｓ１２Ｌ＿５５＿７７７３８１１７と称される）のアミノ酸配列のアライメントを提供する。ボックス内のアミノ酸は、図６Ａ～６ＣのＣａｓ１２Ｌポリペプチドの間で保存されている。Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、図６Ａ～６Ｃのボックス内に記載されるアミノ酸、または図６Ａ～６Ｃに図示される位置にてそのようなアミノ酸の保存的アミノ酸置換を含み得る。

【００６８】

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列のうちのいずれか１つのＲｕｖＣドメイン（これはＲｕｖＣ－Ｉ、ＲｕｖＣ－ＩＩ、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインを含む）と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列のうちのいずれか１つのＲｕｖＣドメイン（これはＲｕｖＣ－Ｉ、ＲｕｖＣ－ＩＩ、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインを含む）と７０％以上の配列同一性（例えば、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列のうちのいずれか１つのＲｕｖＣドメイン（これはＲｕｖＣ－Ｉ、ＲｕｖＣ－ＩＩ、及びＲｕｖＣ－ＩＩＩドメインを含む）を含む。

【００６９】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合するガイドＲＮＡは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ；配列中、「Ｔ」は「Ｕ」と置き換えられる）に図示されるヌクレオチド配列（または場合によってはその逆相補鎖）を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＸまたはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０（例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数であり、Ｘは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか１つ（または場合によってはその逆相補鎖）である。

【００７０】

様々なＣａｓラムダ（Ｃａｓλ；Ｃａｓ１２Ｌ）ガイドＲＮＡのリピート領域のヌクレオチド配列のアライメントが図７に提供される。図７に示されるように、ＣＲＩＳＰＲリピート配列は、ホモログにわたって保存された配列モチーフを含有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合するガイドＲＮＡは、以下のコンセンサス配列：ＷＡＵＵＧＵＵＧＵＡＲＭＷＮＹＹＷＵＵＵＵＲＵＡＷＧＧＷＫＵＲＡＡＣＡＡＣ（配列番号１６２）のヌクレオチド配列（リピート配列、またはタンパク質結合配列）を含み、配列中、Ｗは、ＡまたはＵであり、Ｒは、ＧまたはＡであり、Ｍは、ＡまたはＣであり、Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｃ、またはＵであり、Ｙは、ＵまたはＣであり、Ｋは、ＧまたはＵである。例えば、Ｃａｓラムダ２８ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　２８、図２ＢＢ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＡＡＡＵＡＧＵＡＣＵＵＵＵＡＵＡＧＵＣＵＡＵＡＵＡＣＡＡＣ（配列番号６３）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ３７ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　３７、図２ＫＫ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＡＵＣＵＡＵＵＵＵＧＵＡＡＧＧＵＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号７０）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ２９ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　２９、図２ＣＣ

）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＵＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＵＣＵＵＡＵＵＵＵＧＵＡＵＧＧＡＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６４）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ４２ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　４２、図ＯＯ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＵＣＵＵＡＵＵＵＵＧＵＡＵＧＧＡＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１６３）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダポリペプチド１、３、４、５、７～１５、１８、１９、２１～２７、２９～３５、３８、４０～４６、４８、４９、５３、及び５４（Ｃａｓ１２Ｌ　１、３、４、５、７～１５、１８、１９、２１～２７、２９～３５、３８、４０～４６、４８、４９、５３、及び５４のうちのいずれか１つ；それぞれ図２Ａ、２Ｃ、２Ｄ、２Ｅ、２Ｇ～２Ｏ、２Ｒ、２Ｓ、２Ｕ～２ＡＡ、２ＣＣ～２ＩＩ、２ＬＬ、２ＭＭ～２ＳＳ、２ＵＵ、２ＶＶ、２ＺＺ、及び２ＡＡＡ）のうちのいずれか１つに結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＵＣＵＵＡＵＵＵＵＧＵＡＵＧＧＡＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号５９）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ４７ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　４７、図２ＴＴ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＵＵＵＵＡＵＵＵＵＧＵＡＵＧＧＡＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６５）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ２ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　２、図２Ｂ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＧＡＣＣＵＣＵＵＵＵＵＡＵＡＡＧＧＡＵＵＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号６０）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、図７に図示されるタンパク質結合セグメントを含むガイドＲＮＡと複合体（リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体）を形成することができる。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、図７に図示される異なる配列のタンパク質結合セグメントを含む異なるガイドＲＮＡとＲＮＰ複合体を形成することができる。

【００７１】

別の例として、Ｃａｓラムダ２０ポリペプチドまたはＣａｓラムダ５２ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　２０またはＣａｓ１２Ｌ　５２、それぞれ図２Ｔ及び２ＹＹ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＡＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵＧＣＣＵＵＵＵＵＡＵＡＡＧＧＡＵＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６８）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ５０ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　５０、図２ＷＷ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＡＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵＡＣＣＵＵＵＵＵＧＵＡＡＧＧＡＵＵＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号６６）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ１６ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　１６、図２Ｐ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＵＡＵＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵＡＣＣＵＵＵＵＵＧＵＡＡＧＧＡＵＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６１）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ６ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　６、図２Ｆ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵＡＣＣＵＵＵＵＵＧＵＡＡＧＧＡＵＵＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号１６４）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ５１ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　５１、図２ＸＸ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＵＡＣＵＡＵＵＵＵＵＧＵＡＡＡＧＵＡＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６７）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。別の例として、Ｃａｓラムダ５５ポリペプチド（Ｃａｓ１２Ｌ　５５、図２ＢＢＢ）に結合するガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＵＡＣＡＣＵＵＵＵＵＡＵＡＡＧＧＵＡＵＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号６９）を含むタンパク質結合セグメントを含み得る。

【００７２】

リピート（タンパク質結合）領域において保存された配列モチーフを含有することに加えて、ＣａｓラムダガイドＲＮＡのリピート領域は、ホモログにわたって保存された二次構造を共有する。図８Ａ～８Ｍは、様々なＣａｓラムダガイドＲＮＡのリピート領域の二次構造を図示する。例えば、リピート領域は、ステム及びステム－ループ構造を形成し得

る回文領域を含み得る。

【００７３】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合するガイドＲＮＡは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示される配列のうちのいずれか１つ（または場合によってはその逆相補鎖）と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＸまたはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０（例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数であり、Ｘは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示される配列のうちのいずれか１つと２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するヌクレオチド配列である。

【００７４】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合するガイドＲＮＡは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示される配列のうちのいずれか１つ（または場合によってはその逆相補鎖）と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＸまたはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０（例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数であり、Ｘは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示される配列のうちのいずれか１つと８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するヌクレオチド配列である。

【００７５】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合するガイドＲＮＡは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるヌクレオチド配列（または場合によってはその逆相補鎖）を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列Ｘ（Ｎ）ｎを含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０（例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数であり、Ｘは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか１つ（または場合によってはその逆相補鎖）である。

【００７６】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合するガイドＲＮＡは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示される配列のうちのいずれか１つ（または場合によってはその逆相補鎖）と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列Ｘ（Ｎ）ｎを含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０（例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数であり、Ｘは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１

つ）に図示される配列のうちのいずれか１つと２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するヌクレオチド配列である。

【００７７】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合するガイドＲＮＡは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示される配列のうちのいずれか１つ（または場合によってはその逆相補鎖）と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するヌクレオチド配列を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列Ｘ（Ｎ）ｎを含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０（例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数であり、Ｘは、図２（例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つ）に図示される配列のうちのいずれか１つと８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するヌクレオチド配列である。

【００７８】

図２Ａ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ａに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１＿２５７９０５５０８」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ａに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ａに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ａに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ａに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ａに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ａに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは

、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００７９】

図２Ｂ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｂに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２＿１９６８４８７５３」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｂに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｂに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｂに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｂに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｂに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、６７５アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、６７５ａａ～７００ａａ、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７３５ａａ、７３５ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７３５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｂに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＧＡＣＣＴＣＴＴＴＴＴＡＴＡＡＧＧＡＴＴＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号３）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＧＡＣＣＴＣＴＴＴＴＴＡＴＡＡＧＧＡＴＴＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号４）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８０】

図２Ｃ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｃに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３＿６６７４１１６７」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｃに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｃに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一

性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｃに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｃに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｃに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸（ａａ）～８７５ａａ、例えば、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７８ａａ、７７８ａａ～８００ａａ、８００ａａ～８２５ａａ、８２５ａａ～８５０ａａ、または８５０ａａ～８７５ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７７８アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｃに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８１】

図２Ｄ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｄに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４＿６７０３１１６３」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｄに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｄに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｄに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｄに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｄに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸（ａａ）～８７５ａａ、例えば、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７８ａａ、７７８ａａ～８００ａａ、８００ａａ～８２５ａａ、８２５ａａ～８５０ａａ、または８５０ａａ～８７５ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７７８アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｄに図示されるＣａｓ１２

Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８２】

図２Ｅ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｅに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５＿６７７９３３５１」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｅに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｅに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｅに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｅに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｅに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸（ａａ）～８７５ａａ、例えば、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７８ａａ、７７８ａａ～８００ａａ、８００ａａ～８２５ａａ、８２５ａａ～８５０ａａ、または８５０ａａ～８７５ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７７８アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｅに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８３】

図２Ｆ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｆに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿６＿６７９１２８６９＿部分」と表記されるＣａｓ１

２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約３５０アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｆに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約３５０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｆに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約３５０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｆに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約３５０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｆに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を含む約３５０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｆに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約３５０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、または７５０ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、約７２５アミノ酸～約７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｆに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＡＣＣＴＴＴＴＴＧＴＡＡＧＧＡＴＴＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号５）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＡＣＣＴＴＴＴＴＧＴＡＡＧＧＡＴＴＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号６）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８４】

図２Ｇ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｇに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿７＿６８０９０３１６＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｇに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｇに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｇに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタン

パク質は、図２Ｇに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｇに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、６５０アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、６５０ａａ～７００ａａ、７００ａａ～７１７ａａ、７１７ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、または７５０ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、約７１７アミノ酸～約７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｇに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８５】

図２Ｈ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｈに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿８＿６８３２８２９２＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｈに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｈに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｈに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｈに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｈに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４２ａａ、７４２ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、約７４２アミノ酸～約７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｈに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１

）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８６】

図２Ｉ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｉに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿９＿６８４５４１２４」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｉに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｉに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｉに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｉに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｉに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｉに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８７】

図２Ｊ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｊに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１０＿６８６０５３１３」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｊに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０

％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｊに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｊに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｊに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｊに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸（ａａ）～８２５ａａ、例えば、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、７７５ａａ～７８２ａａ、７８２ａａ～８００ａａ、または８００ａａ～８２５ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７８２アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｊに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８８】

図２Ｋ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｋに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１１＿６９２６６８２１＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｋに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｋに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｋに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｋに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｋに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２

Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｋに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００８９】

図２Ｌ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｌに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１２＿６９４１７２２９＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｌに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｌに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｌに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｌに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｌに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約９２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｌに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２

２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。
【００９０】
図２Ｍ
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｍに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１３＿６９７３３２１４」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｍに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｍに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｍに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｍに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｍに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｍに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。
【００９１】
図２Ｎ
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｎに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１４＿７０２３５２４６＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４２７アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｎに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４２７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｎに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列

同一性）を有する約４２７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｎに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４２７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｎに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約４２７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｎに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約４２７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、４２５アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、４２５ａａ～５００ａａ、５００ａａ～６００ａａ、６００ａａ～７００ａａ、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｎに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００９２】

図２Ｏ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｏに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１５＿７０７２４７４３」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｏに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｏに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｏに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｏに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｏに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｏに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、

４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００９３】

図２Ｐ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｐに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１６＿７０７３１０３８」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｐに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｐに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｐに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｐに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｐに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、６７５アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、６７５ａａ～７００ａａ、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７３５ａａ、７３５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７３５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｐに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＴＡＴＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＡＣＣＴＴＴＴＴＧＴＡＡＧＧＡＴＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号７）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＴＡＴＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＡＣＣＴＴＴＴＴＧＴＡＡＧＧＡＴＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号８）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００９４】

図２Ｑ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｑに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１７＿７０９５９３９１」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上

、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｑに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｑに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｑに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｑに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｑに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。

【００９５】

図２Ｒ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｒに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１８＿７１０７８０８６」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｒに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｒに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｒに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｒに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｒに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｒに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧ

ＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００９６】

図２Ｓ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｓに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿１９＿７１１９３５０９＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約６８０アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｓに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約６８０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｓに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約６８０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｓに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約６８０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｓに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約６８０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｓに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約６８０アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、または７５０ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、約７２５アミノ酸～約７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｓに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００９７】

図２Ｔ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｔに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２０＿７１２１０９５８＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５１６アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク

質は、図２Ｔに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５１６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｔに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５１６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｔに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５１６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｔに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約５１６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｔに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約５１６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、または７５０ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、約７２５アミノ酸～約７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｔに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＡＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＧＣＣＴＴＴＴＴＡＴＡＡＧＧＡＴＴＡＡＡＣＡＡＣＴＴＧ（配列番号９）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＡＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＧＣＣＴＴＴＴＴＡＴＡＡＧＧＡＴＴＡＡＡＣＡＡＣＴＴＧ（配列番号１０）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００９８】

図２Ｕ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｕに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２１＿７１３１７３２１＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｕに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｕに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｕに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｕに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約５８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、

２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｕに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約５８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、または７５０ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、約７２５アミノ酸～約７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｕに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【００９９】

図２Ｖ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｖに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２２＿７１４５６６８７」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｖに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｖに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｖに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｖに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｖに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｖに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１

７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１００】

図２Ｗ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｗに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２３＿７１７０８９７１」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｗに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｗに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｗに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｗに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｗに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、５００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、５００ａａ～５５０ａａ、５５０ａａ～５８５ａａ、５８５ａａ～６００ａａ、６００ａａ～６５０ａａ、６５０ａａ～７００ａａ、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、５８５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｗに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０１】

図２Ｘ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｘに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２４＿４６０３５１６７＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｘに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｘに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の

配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｘに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｘに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｘに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５８ａａ、７５８ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７５８アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｘに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０２】

図２Ｙ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｙに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２５＿４６７８４２５４＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｙに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｙに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｙに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約５９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｙに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約５９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｙに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約５９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、または７５０ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、約７２５アミノ酸～約７７５ア

ミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｙに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０３】

図２Ｚ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｚに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２６＿４６４６４４５１」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｚに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｚに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｚに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２Ｚに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２Ｚに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、６２５アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、６２５ａａ～６４０ａａ、６４０ａａ～６５０ａａ、６５０ａａ～７００ａａ、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、６４０アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２Ｚに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０４】

図２ＡＡ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図

２ＡＡに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２７＿２５４４８９１６４」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０５】

図２ＢＢ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２８＿２５５２３８２９３」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２

Ｌタンパク質は、図２ＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５９ａａ、７５９ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７５９アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＡＡＡＴＡＧＴＡＣＴＴＴＴＡＴＡＧＴＣＴＡＴＡＴＡＣＡＡＣ（配列番号１１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＡＡＡＴＡＧＴＡＣＴＴＴＴＡＴＡＧＴＣＴＡＴＡＴＡＣＡＡＣ（配列番号１２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０６】

図２ＣＣ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿２９＿７２１６７２９４」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＴＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１３）またはその逆相補鎖を含む。場

合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＴＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１４）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０７】

図２ＤＤ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＤＤに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３０＿７２３６９２６９」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０８】

図２ＥＥ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３１＿７２５０３９７６」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、

８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１０９】

図２ＦＦ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３２＿７２５４７６５４＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４７アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約４７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約４７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては

、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１１０】

図２ＧＧ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＧＧに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３３＿７２９０７３９４」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＧＧに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＧＧに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＧＧに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＧＧに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＧＧに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＧＧに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の

整数である。
【０１１１】
図２ＨＨ
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＨＨに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３４＿７３１２４７４３＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２４５アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＨＨに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２４５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＨＨに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２４５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＨＨに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２４５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＨＨに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約２４５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＨＨに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約２４５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＨＨに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。
【０１１２】
図２ＩＩ
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＩＩに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３５＿７３５０３６４９＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約１７８アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＩＩに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約１７８ア

ミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＩＩに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約１７８アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＩＩに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約１７８アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＩＩに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約１７８アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＩＩに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約１７８アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＩＩに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１１３】

図２ＪＪ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＪＪに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３６＿７３５０３６４９＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＪＪに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＪＪに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＪＪに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＪＪに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＪＪに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約８５アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては

、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。

【０１１４】

図２ＫＫ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＫＫに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３７＿７３４７２６２５」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＫＫに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＫＫに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＫＫに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＫＫに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＫＫに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７６７ａａ、７６７ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７６７アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＫＫに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＡＴＣＴＡＴＴＴＴＧＴＡＡＧＧＴＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１５）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＡＴＣＴＡＴＴＴＴＧＴＡＡＧＧＴＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１６）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１１５】

図２ＬＬ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＬＬに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３８＿７３７６４０３９＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約６５２アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＬＬに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９

７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約６５２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＬＬに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約６５２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＬＬに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約６５２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＬＬに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約６５２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＬＬに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約６５２アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＬＬに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１１６】

図２ＭＭ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＭＭに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４０＿７４０３７３０５」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＭＭに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＭＭに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＭＭに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＭＭに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＭＭに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８０

０ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７８２ａａ、または７８２ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７８２アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＭＭに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１１７】

図２ＮＮ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＮＮに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４１＿７４４０８２７３＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＮＮに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＮＮに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＮＮに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＮＮに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＮＮに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、８５０アミノ酸（ａａ）～９５０ａａ、例えば、８５０ａａ～８７５ａａ、８７５ａａ～８８９ａａ、８８９ａａ～９００ａａ、または９００ａａ～９５０ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、８８９アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＮＮに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１１８】
図２ＯＯ
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＯＯに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４２＿７５１８６０７９＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２２３アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＯＯに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２２３アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＯＯに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２２３アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＯＯに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２２３アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＯＯに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約２２３アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＯＯに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約２２３アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＯＯに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１７）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１８）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１１９】
図２ＰＰ
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＰＰに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４３＿７５２５７１０３＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４３９アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＰＰに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４３９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２

ＰＰに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４３９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＰＰに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４３９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＰＰに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約４３９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＰＰに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約４３９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＰＰに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２０】

図２ＱＱ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＱＱに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４４＿７５２５７１０３＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約１９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＱＱに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約１９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＱＱに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約１９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＱＱに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約１９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＱＱに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約１９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＱＱに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約１９６アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例

えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＱＱに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２１】

図２ＲＲ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＲＲに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４５＿７５６１６６０７＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＲＲに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＲＲに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＲＲに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＲＲに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＲＲに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４８ａａ、７４８ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４８アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＲＲに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２２】
図２ＳＳ
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＳＳに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４６＿７５７８４２８９＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４８１アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌ）は、図２ＳＳに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４８１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、図２ＳＳに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４８１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、図２ＳＳに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４８１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、図２ＳＳに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約４８１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＳＳに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約４８１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＳＳに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２３】
図２ＴＴ
場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＴＴに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４７＿７６５１２２２８」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＴＴに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＴＴに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の

配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＴＴに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＴＴに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＴＴに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＴＴに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＴＴＴＡＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１９）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＴＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２０）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２４】

図２ＵＵ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＵＵに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４８＿７６６００４５０」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＵＵに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＵＵに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＵＵに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＵＵに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＵＵに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＵＵに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上

、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２５】

図２ＶＶ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＶＶに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿４９＿４４８８００８１」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＶＶに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＶＶに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＶＶに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＶＶに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＶＶに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＶＶに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２６】

図２ＷＷ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＷＷに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５０＿８３０１２６１３」と表記されるＣａｓ１２

Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＷＷに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＷＷに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＷＷに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＷＷに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＷＷに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７３５ａａ、７３５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７３５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＷＷに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＡＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＡＣＣＴＴＴＴＴＧＴＡＡＧＧＡＴＴＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号２１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＡＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＡＣＣＴＴＴＴＴＧＴＡＡＧＧＡＴＴＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号２２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２７】

図２ＸＸ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＸＸに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５１＿８２９８３３３１」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＸＸに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＸＸに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＸＸに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＸＸに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を

含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＸＸに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７５０アミノ酸（ａａ）～８５０ａａ、例えば、７５０ａａ～７７９ａａ、７７９ａａ～８００ａａ、または８００ａａ～８５０ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７７９アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＸＸに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＴＡＣＴＡＴＴＴＴＴＧＴＡＡＡＧＴＡＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２３）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＴＡＣＴＡＴＴＴＴＴＧＴＡＡＡＧＴＡＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２４）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２８】

図２ＹＹ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＹＹに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５２＿７６７６７８８５」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＹＹに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＹＹに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＹＹに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＹＹに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＹＹに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、５５０アミノ酸（ａａ）～７００ａａ、例えば、５５０ａａ～５９２ａａ、５９２ａａ～６２５ａａ、６２５ａａ～６５０ａａ、または６５０ａａ～７００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、５９２アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＹＹに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＡＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＧＣＣＴＴＴＴＴＡＴＡＡＧＧＡＴＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２５）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＡＴＧＴＴＧＴＡＧＡＴＧＣＣＴＴＴＴＴＡＴＡＡＧＧＡＴＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２６）またはその逆相補鎖を

含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１２９】

図２ＺＺ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＺＺに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５３＿７７２１６４５１」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＺＺに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＺＺに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＺＺに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＺＺに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＺＺに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＺＺに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１３０】

図２ＡＡＡ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡＡに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５４＿７７４６８９１２＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２９アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２９ア

ミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約２９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＡＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約２９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＡＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約２９アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＡＡＡに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１３１】

図２ＢＢＢ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢＢに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５５＿７７７３８１１７」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＢＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＢＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５

０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＢＢＢに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＴＡＣＡＣＴＴＴＴＴＡＴＡＡＧＧＴＡＴＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号２７）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＴＡＣＡＣＴＴＴＴＴＡＴＡＡＧＧＴＡＴＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号２８）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１３２】

図２ＣＣＣ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣＣに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５６＿６５２８６４２５」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＣＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＣＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、６５０アミノ酸（ａａ）～７５０ａａ、例えば、６５０ａａ～６９２ａａ、６９２ａａ～７２５ａａ、または７２５ａａ～７５０ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、６９２アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＣＣＣに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１３３】

図２ＤＤＤ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＤＤＤに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５７＿６５５６７１１８＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４４１アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、図２ＤＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４４１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、図２ＤＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４４１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、図２ＤＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約４４１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、図２ＤＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約４４１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＤＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約４４１アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＤＤＤに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１３４】

図２ＥＥＥ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥＥに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿５８＿６６２８７８５３＿部分」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約３９７アミノ酸の連続したストレッチを含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約３９７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、

８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約３９７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有する約３９７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＥＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有する約３９７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＥＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有する約３９７アミノ酸の連続したストレッチを含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７５０ａａ、７５０ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７２５アミノ酸～７７５アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＥＥＥに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１３５】

図２ＦＦＦ

場合によっては、（対象の組成物及び／または方法の）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦＦに図示され、「Ｃａｓ１２Ｌ＿３９＿７３８７７２２７」と表記されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と２０％以上の配列同一性（例えば、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。例えば、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性（例えば、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、図２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、当該配列が、タンパク質の天然型触媒活性を低減するアミノ酸置換（例えば、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換）を含むことを除き、図２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌタンパク質配列を有するアミノ酸配列を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７００アミノ酸（ａａ）～８００ａａ、例えば、７００ａａ～７２５ａａ、７２５ａａ～７４６ａａ、７４６ａａ～７７５ａａ、または７７５ａａ～８００ａａ）の長さを有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、７４６アミノ酸の長さを有する。場合によっては、Ｃａ

ｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、図２ＦＦＦに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列に対して２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２Ｌポリペプチド）に結合するガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号１）またはその逆相補鎖を含む。場合によっては、ガイドＲＮＡは、ヌクレオチド配列（Ｎ）ｎＡＴＴＧＴＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＡＴＴＴＴＧＴＡＴＧＧＡＧＴＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号２）またはその逆相補鎖を含み、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～３０、例えば、１５～２０、１７～２５、１７～２２、１８～２２、１８～２０、２０～２５、または２５～３０）の整数である。

【０１３６】

Ｃａｓ１２Ｌバリアント

バリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質は、対応する野生型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質のアミノ酸配列と比較したときに、例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と比較したときに、少なくとも１つのアミノ酸が異なる（例えば、欠失、挿入、置換、融合を有する）アミノ酸配列を有する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌバリアントは、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と比較して１個のアミノ酸置換～１０個のアミノ酸置換を含む。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌバリアントは、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるＣａｓ１２Ｌアミノ酸配列と比較して、ＲｕｖＣドメインに１個のアミノ酸置換～１０個のアミノ酸置換を含む。

【０１３７】

バリアント－触媒活性

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、例えば、天然型の触媒的に活性な配列に対して変異したバリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質であり、対応する天然型の配列と比較したときに、低減された切断活性を示す（例えば、９０％以下、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、４０％以下、または３０％以下の切断活性を示す）。場合によっては、そのようなバリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質は、触媒的に「死活」タンパク質であり（実質的に切断活性を有しない）、「ｄＣａｓ１２Ｌ」と称され得る。場合によっては、バリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質は、ニッカーゼ（二本鎖標的核酸、例えば、二本鎖標的ＤＮＡの一方の鎖のみを切断する）である。本明細書でより詳細に説明されるように、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質（場合によっては、野生型切断活性を有するＣａｓ１２Ｌタンパク質、場合によっては、低減された切断活性を有するバリアントＣａｓ１２Ｌ、例えば、ｄＣａｓ１２ＬまたはニッカーゼＣａｓ１２Ｌ）は、関心対象の活性（例えば、関心対象の触媒活性）を有する異種ポリペプチドと融合（コンジュゲート）して、融合タンパク質（融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質）を形成する。

【０１３８】

場合によっては、バリアントＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、図３Ａ～３Ｂに示される活性部位残基の１つ、２つ、または３つのアミノ酸の置換を含み、ここで、バリアントＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、１つ、２つ、または３つの置換を含まない対照Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドと比較して低減された触媒活性を示す。

【０１３９】

バリアント－融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド

上述したように、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質（場合によっては、野生型切断活性を有するＣａｓ１２Ｌタンパク質、場合によっては、低減された切断活性を有するバリアントＣａｓ１２Ｌ、例えば、ｄＣａｓ１２ＬまたはニッカーゼＣａｓ１２Ｌ）は、関心対象の活性（例えば、関心対象の触媒活性）を有する異種ポリペプチドと融合（コンジュゲート）して、融合タンパク質を形成する。Ｃａｓ１２Ｌタンパク質が融合され得

る異種ポリペプチドは、本明細書において「融合パートナー」と称される。
【０１４０】
場合によっては、融合パートナーは、標的ＤＮＡの転写を調節する（例えば、転写を阻害する、転写を増加させる）ことができる。例えば、場合によっては、融合パートナーは、転写を阻害するタンパク質（またはタンパク質由来のドメイン）（例えば、転写リプレッサー、転写阻害剤タンパク質の動員、メチル化等の標的ＤＮＡの修飾、ＤＮＡ修飾因子の動員、標的ＤＮＡと会合したヒストンの調節、ヒストンのアセチル化及び／またはメチル化を変更するもの等のヒストン修飾因子の動員等を介して機能するタンパク質）である。場合によっては、融合パートナーは、転写を増加させるタンパク質（またはタンパク質からのドメイン）（例えば、転写アクティベーター、転写アクティベータータンパク質の動員、脱メチル化等の標的ＤＮＡの修飾、ＤＮＡ修飾因子の動員、標的ＤＮＡに関連したヒストンの調節、ヒストンのアセチル化及び／またはメチル化を変更するもの等のヒストン修飾因子の動員等を介して機能するタンパク質）である。
【０１４１】
場合によっては、融合パートナー（異種ポリペプチド）は、逆転写酵素である。場合によっては、融合パートナーは、塩基エディターである。場合によっては、融合パートナー（異種ポリペプチド）は、デアミナーゼである。
【０１４２】
場合によっては、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、標的核酸を修飾する酵素活性（例えば、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、またはグリコシラーゼ活性）を有する異種ポリペプチドを含む。
【０１４３】
場合によっては、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、標的核酸と会合したポリペプチド（例えば、ヒストン）を修飾する酵素活性（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、または脱ミリストイル化活性）を有する異種ポリペプチドを含む。
【０１４４】
転写の増加に使用され得るタンパク質（またはその断片）の例としては、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ＶＰ４８、ＶＰ１６０、ｐ６５サブドメイン（例えば、ＮＦｋＢから）、ならびにＥＤＬＬの活性化ドメイン、及び／またはＴＡＬ活性化ドメイン（例えば、植物における活性のため）等の転写アクティベーター；ＳＥＴ１Ａ、ＳＥＴ１Ｂ、ＭＬＬ１～５、ＡＳＨ１、ＳＹＭＤ２、ＮＳＤ１等のヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ；ＪＨＤＭ２ａ／ｂ、ＵＴＸ、ＪＭＪＤ３等のヒストンリジンデメチラーゼ；ＧＣＮ５、ＰＣＡＦ、ＣＢＰ、ｐ３００、ＴＡＦ１、ＴＩＰ６０／ＰＬＩＰ、ＭＯＺ／ＭＹＳＴ３、ＭＯＲＦ／ＭＹＳＴ４、ＳＲＣ１、ＡＣＴＲ、Ｐ１６０、ＣＬＯＣＫ等のヒストンアセチルトランスフェラーゼ；ならびに１０－１１転座（Ｔｅｎ－Ｅｌｅｖｅｎ　Ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ）（ＴＥＴ）ジオキシゲナーゼ１（ＴＥＴ１ＣＤ）、ＴＥＴ１、ＤＭＥ、ＤＭＬ１、ＤＭＬ２、ＲＯＳ１等のＤＮＡデメチラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。
【０１４５】
転写の減少に使用され得るタンパク質（またはその断片）の例としては、Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢまたはＳＫＤ）等の転写リプレッサー；ＫＯＸ１抑制ドメイン；Ｍａｄ　ｍＳＩＮ３相互作用ドメイン（ＳＩＤ）；ＥＲＦリプレッサードメイン（ＥＲＤ）、ＳＲＤＸ抑制ドメイン（例えば、植物における抑制のため）等；Ｐｒ－ＳＥＴ７／８、ＳＵＶ４－２０Ｈ１、ＲＩＺ１等のヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ；ＪＭ

ＪＤ２Ａ／ＪＨＤＭ３Ａ、ＪＭＪＤ２Ｂ、ＪＭＪＤ２Ｃ／ＧＡＳＣ１、ＪＭＪＤ２Ｄ、ＪＡＲＩＤ１Ａ／ＲＢＰ２、ＪＡＲＩＤ１Ｂ／ＰＬＵ－１、ＪＡＲＩＤ１Ｃ／ＳＭＣＸ、ＪＡＲＩＤ１Ｄ／ＳＭＣＹ等のヒストンリジンデメチラーゼ；ＨＤＡＣ１、ＨＤＡＣ２、ＨＤＡＣ３、ＨＤＡＣ８、ＨＤＡＣ４、ＨＤＡＣ５、ＨＤＡＣ７、ＨＤＡＣ９、ＳＩＲＴ１、ＳＩＲＴ２、ＨＤＡＣ１１等のヒストンリジンデアセチラーゼ；ＨｈａＩ　ＤＮＡ　ｍ５ｃ－メチルトランスフェラーゼ（Ｍ．ＨｈａＩ）、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ１（ＤＮＭＴ１）、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ３ａ（ＤＮＭＴ３ａ）、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ３ｂ（ＤＮＭＴ３ｂ）、ＭＥＴＩ、ＤＲＭ３（植物）、ＺＭＥＴ２、ＣＭＴ１、ＣＭＴ２（植物）等のＤＮＡメチラーゼ；及びＬａｍｉｎ　Ａ、Ｌａｍｉｎ　Ｂ等の末梢動員エレメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４６】

場合によっては、融合パートナーは、標的核酸（例えば、ｓｓＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ）を修飾する酵素活性を有する。融合パートナーによって提供され得る酵素活性の例としては、制限酵素（例えば、ＦｏｋＩヌクレアーゼ）によって提供されるもの等のヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ（例えば、ＨｈａＩ　ＤＮＡ　ｍ５ｃ－メチルトランスフェラーゼ（Ｍ．ＨｈａＩ）、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ１（ＤＮＭＴ１）、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ３ａ（ＤＮＭＴ３ａ）、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ３ｂ（ＤＮＭＴ３ｂ）、ＭＥＴＩ、ＤＲＭ３（植物）、ＺＭＥＴ２、ＣＭＴ１、ＣＭＴ２（植物）等）によって提供されるもの等のメチルトランスフェラーゼ活性；デメチラーゼ（例えば、１０－１１転座（ＴＥＴ）ジオキシゲナーゼ１（ＴＥＴ１ＣＤ）、ＴＥＴ１、ＤＭＥ、ＤＭＬ１、ＤＭＬ２、ＲＯＳ１等）によって提供されるもの等のデメチラーゼ活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、デアミナーゼ（例えば、ラットＡＰＯＢＥＣ１等のシトシンデアミナーゼ酵素）によって提供されるもの等の脱アミン化活性、ジムスターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ及び／またはレゾルバーゼ（例えば、Ｇｉｎインベルターゼの超活性変異体、ＧｉｎＨ１０６Ｙ等のＧｉｎインベルターゼ；ヒト免疫不全ウイルス１型インテグラーゼ（ＩＮ）；Ｔｎ３レゾルバーゼ等）によってもたらされるもの等のインテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ（例えば、Ｇｉｎリコンビナーゼの触媒ドメイン）によって提供されるもの等のリコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、及びグリコシラーゼ活性）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４７】

場合によっては、融合パートナーは、標的核酸（例えば、ｓｓＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ）に会合したタンパク質（例えば、ヒストン、ＲＮＡ結合タンパク質、ＤＮＡ結合タンパク質等）を修飾する酵素活性を有する。融合パートナーによって提供され得る（標的核酸に会合したタンパク質を修飾する）酵素活性の例としては、ヒストンメチルトランスフェラーゼ（ＨＭＴ）（例えば、斑入り３～９ホモログ１のサプレッサー（ＳＵＶ３９Ｈ１、ＫＭＴ１Ａとしても知られる）、真性染色質ヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ２（Ｇ９Ａ、ＫＭＴ１Ｃ及びＥＨＭＴ２としても知られる）、ＳＵＶ３９Ｈ２、ＥＳＥＴ／ＳＥＴＤＢ１等、ＳＥＴ１Ａ、ＳＥＴ１Ｂ、ＭＬＬ１～５、ＡＳＨ１、ＳＹＭＤ２、ＮＳＤ１、ＤＯＴ１Ｌ、Ｐｒ－ＳＥＴ７／８、ＳＵＶ４－２０Ｈ１、ＥＺＨ２、ＲＩＺ１）によって提供されるもの等のメチルトランスフェラーゼ活性、ヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンデメチラーゼ１Ａ（ＫＤＭ１Ａ、ＬＳＤ１としても知られる）、ＪＨＤＭ２ａ／ｂ、ＪＭＪＤ２Ａ／ＪＨＤＭ３Ａ、ＪＭＪＤ２Ｂ、ＪＭＪＤ２Ｃ／ＧＡＳＣ１、ＪＭＪＤ２Ｄ、ＪＡＲＩＤ１Ａ／ＲＢＰ２、ＪＡＲＩＤ１Ｂ／ＰＬＵ－１、ＪＡＲＩＤ１Ｃ／ＳＭＣＸ、ＪＡＲＩＤ１Ｄ／ＳＭＣＹ、ＵＴＸ、ＪＭＪＤ３等）によって提供されるもの等のデメチラーゼ活性、ヒストンアセチラーゼトランスフェラーゼ（例えば、ヒトアセチルトランスフェラーゼｐ３００、ＧＣＮ５、ＰＣＡＦ、ＣＢＰ、ＴＡＦ１、ＴＩＰ６０／ＰＬＩＰ、ＭＯＺ／ＭＹＳＴ３、ＭＯＲＦ／ＭＹＳＴ４、ＨＢＯ１／ＭＹＳＴ２、ＨＭＯＦ／ＭＹＳＴ１、ＳＲＣ１、ＡＣＴＲ、Ｐ１６０、ＣＬＯＣＫ等の触

媒コア／断片）によって提供されるもの等のアセチルトランスフェラーゼ活性、ヒストンデアセチラーゼ（例えば、ＨＤＡＣ１、ＨＤＡＣ２、ＨＤＡＣ３、ＨＤＡＣ８、ＨＤＡＣ４、ＨＤＡＣ５、ＨＤＡＣ７、ＨＤＡＣ９、ＳＩＲＴ１、ＳＩＲＴ２、ＨＤＡＣ１１等）によって提供されるもの等のデアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、及び脱ミリストイル化活性が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４８】

好適な融合パートナーの追加の例は、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）不安定化ドメイン（例えば、化学的に制御可能な融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質を作製するため）、及び葉緑体輸送ペプチドである。好適な葉緑体輸送ペプチドには、
ＭＡＳＭＩＳＳＳＡＶＴＴＶＳＲＡＳＲＧＱＳＡＡＭＡＰＦＧＧＬＫＳＭＴＧＦＰＶＲＫＶＮＴＤＩＴＳＩＴＳＮＧＧＲＶＫＣＭＱＶＷＰＰＩＧＫＫＫＦＥＴＬＳＹＬＰＰＬＴＲＤＳＲＡ（配列番号２９）、
ＭＡＳＭＩＳＳＳＡＶＴＴＶＳＲＡＳＲＧＱＳＡＡＭＡＰＦＧＧＬＫＳＭＴＧＦＰＶＲＫＶＮＴＤＩＴＳＩＴＳＮＧＧＲＶＫＳ（配列番号３０）、
ＭＡＳＳＭＬＳＳＡＴＭＶＡＳＰＡＱＡＴＭＶＡＰＦＮＧＬＫＳＳＡＡＦＰＡＴＲＫＡＮＮＤＩＴＳＩＴＳＮＧＧＲＶＮＣＭＱＶＷＰＰＩＥＫＫＫＦＥＴＬＳＹＬＰＤＬＴＤＳＧＧＲＶＮＣ（配列番号３１）、
ＭＡＱＶＳＲＩＣＮＧＶＱＮＰＳＬＩＳＮＬＳＫＳＳＱＲＫＳＰＬＳＶＳＬＫＴＱＱＨＰＲＡＹＰＩＳＳＳＷＧＬＫＫＳＧＭＴＬＩＧＳＥＬＲＰＬＫＶＭＳＳＶＳＴＡＣ（配列番号３２）、
ＭＡＱＶＳＲＩＣＮＧＶＷＮＰＳＬＩＳＮＬＳＫＳＳＱＲＫＳＰＬＳＶＳＬＫＴＱＱＨＰＲＡＹＰＩＳＳＳＷＧＬＫＫＳＧＭＴＬＩＧＳＥＬＲＰＬＫＶＭＳＳＶＳＴＡＣ（配列番号３３）、
ＭＡＱＩＮＮＭＡＱＧＩＱＴＬＮＰＮＳＮＦＨＫＰＱＶＰＫＳＳＳＦＬＶＦＧＳＫＫＬＫＮＳＡＮＳＭＬＶＬＫＫＤＳＩＦＭＱＬＦＣＳＦＲＩＳＡＳＶＡＴＡＣ（配列番号３４）、
ＭＡＡＬＶＴＳＱＬＡＴＳＧＴＶＬＳＶＴＤＲＦＲＲＰＧＦＱＧＬＲＰＲＮＰＡＤＡＡＬＧＭＲＴＶＧＡＳＡＡＰＫＱＳＲＫＰＨＲＦＤＲＲＣＬＳＭＶＶ（配列番号３５）、
ＭＡＡＬＴＴＳＱＬＡＴＳＡＴＧＦＧＩＡＤＲＳＡＰＳＳＬＬＲＨＧＦＱＧＬＫＰＲＳＰＡＧＧＤＡＴＳＬＳＶＴＴＳＡＲＡＴＰＫＱＱＲＳＶＱＲＧＳＲＲＦＰＳＶＶＶＣ（配列番号３６）、
ＭＡＳＳＶＬＳＳＡＡＶＡＴＲＳＮＶＡＱＡＮＭＶＡＰＦＴＧＬＫＳＡＡＳＦＰＶＳＲＫＱＮＬＤＩＴＳＩＡＳＮＧＧＲＶＱＣ（配列番号３７）、
ＭＥＳＬＡＡＴＳＶＦＡＰＳＲＶＡＶＰＡＡＲＡＬＶＲＡＧＴＶＶＰＴＲＲＴＳＳＴＳＧＴＳＧＶＫＣＳＡＡＶＴＰＱＡＳＰＶＩＳＲＳＡＡＡＡ（配列番号３８）、及び
ＭＧＡＡＡＴＳＭＱＳＬＫＦＳＮＲＬＶＰＰＳＲＲＬＳＰＶＰＮＮＶＴＣＮＮＬＰＫＳＡＡＰＶＲＴＶＫＣＣＡＳＳＷＮＳＴＩＮＧＡＡＡＴＴＮＧＡＳＡＡＳＳ（配列番号３９）
が含まれるが、これらに限定されない。

【０１４９】

場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、ｂ）葉緑体輸送ペプチドとを含む。したがって、例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド／ガイドＲＮＡ複合体は、葉緑体へと標的指向化され得る。場合によっては、この標的指向化は、葉緑体輸送ペプチド（ＣＴＰ）またはプラスチド輸送ペプチドと呼ばれるＮ末端伸長の存在によって達成され得る。細菌源からの染色体導入遺伝子は、発現されたポリペプチドが、植物プラスチド（例えば、葉緑体）内で区画化される場合、発現されたポリペプチドをコードする配列と融合されたＣＴＰ配列をコードする配列を有していなければならない。したがって、葉緑体への外因性ポリペプチドの局在は、多くの場合、ＣＴＰ配列をコードするポリヌクレオチド配列を、その外因性ポリペプチドをコード

するポリヌクレオチドの５’領域に作動可能に連結する手段によって達成される。ＣＴＰは、プラスチドへの移行中のプロセシングステップにおいて除去される。しかしながら、プロセシング効率は、ＣＴＰのアミノ酸配列及びペプチドのアミノ末端（NH_2末端）における付近の配列によって影響され得る。記載されている葉緑体へと標的指向させるための他のオプションは、トウモロコシｃａｂ－ｍ７シグナル配列（米国特許第７，０２２，８９６号、ＷＯ９７／４１２２８）、エンドウグルタチオン還元酵素シグナル配列（ＷＯ９７／４１２２８）、及びＵＳ２００９０２９８６１に記載されるＣＴＰである。

【０１５０】

場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、ｂ）エンドソーム脱出ペプチドとを含み得る。場合によっては、エンドソーム脱出ポリペプチドは、アミノ酸配列ＧＬＦＸＡＬＬＸＬＬＸＳＬＷＸＬＬＬＸＡ（配列番号７２）を含み、配列中、各Ｘは、独立して、リジン、ヒスチジン、及びアルギニンから選択される。場合によっては、エンドソーム脱出ポリペプチドは、アミノ酸配列ＧＬＦＨＡＬＬＨＬＬＨＳＬＷＨＬＬＬＨＡ（配列番号７３）を含む。

【０１５１】

Ｃａｓ９、亜鉛フィンガー、及び／またはＴＡＬＥタンパク質との融合の関連において（部位特異的標的核酸改変、転写の調節、及び／または標的タンパク質修飾、例えば、ヒストン修飾のために）使用される上記の融合パートナー（及びその他）のうちのいくつかの例については、例えば、Ｎｏｍｕｒａ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．２００７ Ｊｕｌ １８；１２９（２８）：８６７６－７、Ｒｉｖｅｎｂａｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃｓ．２０１２ Ａｐｒ；７（４）：３５０－６０、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１６ Ｊｕｌ ８；４４（１２）：５６１５－２８、Ｇｉｌｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｊｕｌ １８；１５４（２）：４４２－５１、Ｋｅａｒｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１５ Ｍａｙ；１２（５）：４０１－３、Ｍｅｎｄｅｎｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３ Ｄｅｃ；３１（１２）：１１３３－６、Ｈｉｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５ Ｍａｙ；３３（５）：５１０－７、Ｇｏｒｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００９ Ｍａｒ ３１；１０６（１３）：５０５３－８、Ａｋｏｐｉａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００３ Ｊｕｌ ２２；１００（１５）：８６８８－９１、Ｔａｎ ｅｔ．，ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．２００６ Ｆｅｂ；８０（４）：１９３９－４８、Ｔａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００３ Ｏｃｔ １４；１００（２１）：１１９９７－２００２、Ｐａｐｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００３ Ｆｅｂ １８；１００（４）：１６２１－６、Ｓａｎｊａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１２Ｊａｎ ５；７（１）：１７１－９２、Ｂｅｅｒｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９９８ Ｄｅｃ ８；９５（２５）：１４６２８－３３、Ｓｎｏｗｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｂｉｏｌ．２００２ Ｄｅｃ ２３；１２（２４）：２１５９－６６、Ｘｕ ｅｔ．ａｌ．，Ｘｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｃｏｖ．２０１６ Ｍａｙ ３；２：１６００９、Ｋｏｍｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２０１６ Ａｐｒ ２０；５３３（７６０３）：４２０－４、Ｃｈａｉｋｉｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１６ Ａｕｇ １１、Ｃｈｏｕｄｈｕｒｙ ａｔ．ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ．２０１６ Ｊｕｎ ２３、Ｄｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１６ Ｊａｎ ４、Ｐｈａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１６；１３５８：４３－５７、Ｂａｌｂｏａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ．２０１５ Ｓｅｐ ８；５（３）：４４８－５９、Ｈａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｒｅｐ．２０１５ Ｊｕｎ ９；５：１１２２１、Ｐｉａｔｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ．２０１５ Ｍａｙ；１３（４）：５７８－８９、Ｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅ

ｓ．２０１４　Ａｐｒ；４２（７）：４３７５－９０、Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．２０１３　Ｏｃｔ；２３（１０）：１１６３－７１、及びＭａｅｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１３　Ｏｃｔ；１０（１０）：９７７－９を参照されたい。

【０１５２】

追加の好適な異種ポリペプチドとしては、標的核酸の転写及び／または翻訳の増加を直接的及び／または間接的に提供するポリペプチド（例えば、転写アクティベーターもしくはその断片、転写アクティベーターを動員するタンパク質もしくはその断片、小分子／薬物応答性転写及び／または翻訳調節因子、翻訳調節タンパク質等）が挙げられるが、これらに限定されない。転写の増加または減少を達成する異種ポリペプチドの非限定的な例としては、転写アクティベーター及び転写リプレッサードメインが挙げられる。いくつかのそのような実例では、融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、ガイド核酸（ガイドＲＮＡ）によって標的核酸中の特定の位置（すなわち、配列）へと標的指向化され、プロモーター（これは転写アクティベーターの機能を選択的に阻害する）へのＲＮＡポリメラーゼ結合を遮断する、及び／または局所的なクロマチン状態を修飾する（例えば、標的核酸を修飾する、もしくは標的核酸と会合したポリペプチドを修飾する融合配列が使用される場合）等の座位特異的調節を行使する。場合によっては、変化は、一過性である（例えば、転写抑制または活性化）。場合によっては、変化は、遺伝性である（例えば、標的核酸に対して、または標的核酸に会合したタンパク質、例えば、ヌクレオソームヒストンに対して後成的修飾が行われる場合）。

【０１５３】

ｓｓＲＮＡ標的核酸を標的とするときに使用するための異種ポリペプチドの非限定的な例としては、スプライシング因子（例えば、ＲＳドメイン）；タンパク質翻訳構成要素（例えば、翻訳開始、伸長、及び／または放出因子、例えば、ｅＩＦ４Ｇ）；ＲＮＡメチラーゼ；ＲＮＡ編集酵素（例えば、ＡからＩへの、及び／またはＣからＵへの編集酵素を含む、ＲＮＡデアミナーゼ、例えば、ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ））；ヘリカーゼ；ＲＮＡ結合タンパク質等が挙げられる（ただし、これらに限定されない）。異種ポリペプチドは、タンパク質全体を含み得るか、または場合によっては、タンパク質の断片（例えば、機能的ドメイン）を含み得ることが理解される。

【０１５４】

対象の融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドの異種ポリペプチドは、一過性または不可逆的、直接的または間接的にかかわらず、ｓｓＲＮＡと相互作用することができる任意のドメイン（本開示の目的において、分子内及び／または分子間二次構造、例えば、ヘアピン、ステムループ等の二本鎖ＲＮＡ二重鎖を含む）であり得、これには、エンドヌクレアーゼ（例えば、ＳＭＧ５及びＳＭＧ６等のタンパク質由来のＲＮａｓｅ　ＩＩＩ、ＣＲＲ２２　ＤＹＷドメイン、Ｄｉｃｅｒ、及びＰＩＮ（ＰｉｌＴ　Ｎ末端）ドメイン）；ＲＮＡ切断の刺激に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＣＰＳＦ、ＣｓｔＦ、ＣＦＩｍ、及びＣＦＩＩｍ）；エキソヌクレアーゼ（例えば、ＸＲＮ－１またはエキソヌクレアーゼＴ）；デアデニラーゼ（例えば、ＨＮＴ３）；ナンセンス媒介型ＲＮＡ分解に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＵＰＦ１、ＵＰＦ２、ＵＰＦ３、ＵＰＦ３ｂ、ＲＮＰ　Ｓ１、Ｙ１４、ＤＥＫ、ＲＥＦ２、及びＳＲｍ１６０）；ＲＮＡの安定化に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＰＡＢＰ）；翻訳の抑制に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、Ａｇｏ２及びＡｇｏ４）；翻訳の刺激に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、Ｓｔａｕｆｅｎ）；翻訳の調節に関与する（例えば、調節することができる）タンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、開始因子、伸長因子、放出因子等の翻訳因子、例えば、ｅＩＦ４Ｇ）；ＲＮＡのポリアデニル化に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＰＡＰ１、ＧＬＤ－２、及びＳｔａｒ－ＰＡＰ）；ＲＮＡのポリウリジン化に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＣＩ　Ｄ１及び末端ウリジレートトランスフェラーゼ）；ＲＮＡ局在に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＩＭＰ１、ＺＢＰ１、

Ｓｈｅ２ｐ、Ｓｈｅ３ｐ、及びＢｉｃａｕｄａｌ－Ｄ由来）；ＲＮＡの核保持に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、Ｒｒｐ６）；ＲＮＡの核外搬出に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＴＡＰ、ＮＸＦ１、ＴＨＯ、ＴＲＥＸ、ＲＥＦ、及びＡｌｙ）；ＲＮＡスプライシングの抑制に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＰＴＢ、Ｓａｍ６８、及びｈｎＲＮＰ　Ａ１）；ＲＮＡスプライシングの刺激に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、セリン／アルギニンリッチ（ＳＲ）ドメイン）；転写効率の低減に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＦＵＳ（ＴＬＳ））；ならびに転写の刺激に関与するタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、ＣＤＫ７及びＨＩＶ　Ｔａｔ）を含む群から選択されるエフェクタードメインが含まれるが、これらに限定されない。代替として、エフェクタードメインは、エンドヌクレアーゼ；ＲＮＡ切断を刺激することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；エキソヌクレアーゼ；デアデニラーゼ；ナンセンス媒介型ＲＮＡ分解活性を有するタンパク質及びタンパク質ドメイン；ＲＮＡを安定化することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；翻訳を抑制することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；翻訳を刺激することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；翻訳を調節することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン（例えば、開始因子、伸長因子、放出因子等の翻訳因子、例えば、ｅＩＦ４Ｇ）；ＲＮＡをポリアデニル化することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；ＲＮＡをポリウリジン化することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；ＲＮＡ局在活性を有するタンパク質及びタンパク質ドメイン；ＲＮＡの核保持が可能なタンパク質及びタンパク質ドメイン；ＲＮＡ核外搬出活性を有するタンパク質及びタンパク質ドメイン；ＲＮＡスプライシングを抑制することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；ＲＮＡスプライシングを刺激することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；転写効率を低減することができるタンパク質及びタンパク質ドメイン；ならびに転写を刺激することができるタンパク質及びタンパク質ドメインを含む群から選択されてもよい。別の好適な異種ポリペプチドは、ＷＯ２０１２０６８６２７（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）により詳細に説明されるＰＵＦ　ＲＮＡ結合ドメインである。

【０１５５】

融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドの異種ポリペプチドとして（全体でまたはその断片として）使用され得るいくつかのＲＮＡスプライシング因子は、別個の配列特異的ＲＮＡ結合モジュール及びスプライシングエフェクタードメインを有する、モジュール機構を有する。例えば、セリン／アルギニンリッチ（ＳＲ）タンパク質ファミリーのメンバーは、エクソン封入を促進するプレｍＲＮＡ及びＣ末端ＲＳドメインにおいてエクソンスプライシングエンハンサー（ＥＳＥ）に結合するＮ末端ＲＮＡ認識モチーフ（ＲＲＭ）を含有する。別の例として、ｈｎＲＮＰタンパク質ｈｎＲＮＰ　Ａｌは、そのＲＲＭドメインを通してエクソンスプライシングサイレンサー（ＥＳＳ）に結合し、Ｃ末端グリシンリッチドメインを通してエクソン封入を阻害する。いくつかのスプライシング因子は、２つの選択的部位の間の調節配列に結合することによって、スプライス部位（ｓｓ）の選択的使用を調節することができる。例えば、ＡＳＦ／ＳＦ２は、ＥＳＥを認識し、イントロン近位部位の使用を促進することができるが、ｈｎＲＮＰ　Ａｌは、ＥＳＳに結合し、スプライシングをイントロン遠隔部位の使用に変更することができる。そのような因子の１つの用途は、内因性遺伝子、特に疾患関連遺伝子の選択的スプライシングを調節するＥＳＦを作製することである。例えば、Ｂｃｌ－ｘ　ｐｒｅ－ｍＲＮＡは、２つの選択的５’スプライス部位を有する２つのスプライシングアイソフォームを生み出して、反対の機能のタンパク質をコードする。長いスプライシングアイソフォームＢｃｌ－ｘＬは、長命の分裂終了細胞中で発現される強力なアポトーシス阻害因子であり、多くのがん細胞中で上方調節され、アポトーシスシグナルから細胞を保護する。短いアイソフォームＢｃｌ－ｘＳは、アポトーシス促進アイソフォームであり、高いターンオーバー速度で細胞中に高レベルで発現される（例えば、リンパ球発達）。２つのＢｃｌ－ｘスプライシングアイソフォームの比は、コアエクソン領域またはエクソン伸長領域のいずれか（すなわち、２つの代替５’スプ

ライス部位の間）に位置する複数のｃωエレメントによって調節される。さらなる例については、ＷＯ２０１００７５３０３（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０１５６】

さらなる好適な融合パートナーとしては、境界エレメント（例えば、ＣＴＣＦ）であるタンパク質（またはその断片）、末梢動員を提供するタンパク質及びその断片（例えば、Ｌａｍｉｎ　Ａ，Ｌａｍｉｎ　Ｂ等）、タンパク質ドッキングエレメント（例えば、ＦＫＢＰ／ＦＲＢ、Ｐｉｌ１／Ａｂｙ１等）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５７】

ヌクレアーゼ

場合によっては、対象の融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、ｉｉ）異種ポリペプチド（「融合パートナー」）とを含み、ここで、異種ポリペプチドはヌクレアーゼである。好適なヌクレアーゼとしては、ホーミングヌクレアーゼポリペプチド、ＦｏｋＩポリペプチド、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）ポリペプチド、ＭｅｇａＴＡＬポリペプチド、メガヌクレアーゼポリペプチド、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＡＲＣＵＳヌクレアーゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。メガヌクレアーゼは、ＬＡＤＬＩＤＡＤＧホーミングエンドヌクレアーゼ（ＬＨＥ）から操作することができる。メガＴＡＬポリペプチドは、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメイン及び操作されたメガヌクレアーゼを含み得る。例えば、ＷＯ２００４／０６７７３６（ホーミングエンドヌクレアーゼ）、Ｕｒｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｎａｔｕｒｅ　４３５：６４６（ＺＦＮ）、Ｍｕｓｓｏｌｉｎｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｎｕｃｌｅ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３９：９２８３（ＴＡＬＥヌクレアーゼ）、Ｂｏｉｓｓｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．４２：２５９１（ＭｅｇａＴＡＬ）を参照されたい。

【０１５８】

逆転写酵素

場合によっては、対象の融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、ｉｉ）異種ポリペプチド（「融合パートナー」）とを含み、ここで、異種ポリペプチドは、逆転写酵素ポリペプチドである。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、触媒的に不活性である。好適な逆転写酵素としては、例えば、マウス白血病ウイルス逆転写酵素、ラウス肉腫ウイルス逆転写酵素、ヒト免疫不全ウイルスＩ型逆転写酵素、モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素等が挙げられる。

【０１５９】

塩基エディター

場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、ｉｉ）異種ポリペプチド（「融合パートナー」）とを含み、ここで、異種ポリペプチドは、塩基エディターである。好適な塩基エディターとしては、例えば、アデノシンデアミナーゼ、シチジンデアミナーゼ（例えば、活性化誘導シチジンデアミナーゼ（ＡＩＤ））、ＡＰＯＢＥＣ３Ｇ等）等が挙げられる。

【０１６０】

好適なアデノシンデアミナーゼは、ＤＮＡ中のアデノシンを脱アミノ化することができる任意の酵素である。場合によっては、デアミナーゼは、ＴａｄＡデアミナーゼである。

【０１６１】

場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下のアミノ酸配列：ＭＳＥＶＥＦＳＨＥＹＷＭＲＨＡＬＴＬＡＫＲＡＷＤＥＲＥＶＰＶＧＡＶＬＶＨＮＮＲＶＩＧＥＧＷＮＲＰＩＧＲＨＤＰＴＡＨＡＥＩＭＡＬＲＱＧＧＬＶＭＱＮＹＲＬＩＤＡＴＬＹＶＴＬＥＰＣＶＭＣＡＧＡＭＩＨＳＲＩＧＲＶＶＦＧＡＲＤＡＫＴＧＡＡＧＳＬＭＤＶＬＨＨＰＧＭＮＨＲＶＥＩＴＥＧＩＬＡＤＥＣＡＡＬＬＳＤＦＦＲＭＲＲＱＥＩＫＡＱＫＫＡＱＳＳＴＤ（配列番号７４）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸

配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０１６２】
場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下のアミノ酸配列：ＭＲＲＡＦＩＴＧＶＦＦＬＳＥＶＥＦＳＨＥＹＷＭＲＨＡＬＴＬＡＫＲＡＷＤＥＲＥＶＰＶＧＡＶＬＶＨＮＮＲＶＩＧＥＧＷＮＲＰＩＧＲＨＤＰＴＡＨＡＥＩＭＡＬＲＱＧＧＬＶＭＱＮＹＲＬＩＤＡＴＬＹＶＴＬＥＰＣＶＭＣＡＧＡＭＩＨＳＲＩＧＲＶＶＦＧＡＲＤＡＫＴＧＡＡＧＳＬＭＤＶＬＨＨＰＧＭＮＨＲＶＥＩＴＥＧＩＬＡＤＥＣＡＡＬＬＳＤＦＦＲＭＲＲＱＥＩＫＡＱＫＫＡＱＳＳＴＤ（配列番号７５）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０１６３】
場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下の黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）ＴａｄＡアミノ酸配列：ＭＧＳＨＭＴＮＤＩＹＦＭＴＬＡＩＥＥＡＫＫＡＡＱＬＧＥＶＰＩＧＡＩＩＴＫＤＤＥＶＩＡＲＡＨＮＬＲＥＴＬＱＱＰＴＡＨＡＥＨＩＡＩＥＲＡＡＫＶＬＧＳＷＲＬＥＧＣＴＬＹＶＴＬＥＰＣＶＭＣＡＧＴＩＶＭＳＲＩＰＲＶＶＹＧＡＤＤＰＫＧＧＣＳＧＳＬＭＮＬＬＱＱＳＮＦＮＨＲＡＩＶＤＫＧＶＬＫＥＡＣＳＴＬＬＴＴＦＦＫ　ＮＬＲＡＮＫＫＳＴＮ：（配列番号７６）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０１６４】
場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下の枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）ＴａｄＡアミノ酸配列：ＭＴＱＤＥＬＹＭＫＥＡＩＫＥＡＫＫＡＥＥＫＧＥＶＰＩＧＡＶＬＶＩＮＧＥＩＩＡＲＡＨＮＬＲＥＴＥＱＲＳＩＡＨＡＥＭＬＶＩＤＥＡＣＫＡＬＧＴＷＲＬＥＧＡＴＬＹＶＴＬＥＰＣＰＭＣＡＧＡＶＶＬＳＲＶＥＫＶＶＦＧＡＦＤＰＫＧＧＣＳＧＴＬＭＮＬＬＱＥＥＲＦＮＨＱＡＥＶＶＳＧＶＬＥＥＥＣＧＧＭＬＳＡＦＦＲＥＬＲＫＫＫＫＡＡＲＫＮＬＳＥ（配列番号７７）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０１６５】
場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下のサルモネラ・チフィリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）ＴａｄＡ：ＭＰＰＡＦＩＴＧＶＴＳＬＳＤＶＥＬＤＨＥＹＷＭＲＨＡＬＴＬＡＫＲＡＷＤＥＲＥＶＰＶＧＡＶＬＶＨＮＨＲＶＩＧＥＧＷＮＲＰＩＧＲＨＤＰＴＡＨＡＥＩＭＡＬＲＱＧＧＬＶＬＱＮＹＲＬＬＤＴＴＬＹＶＴＬＥＰＣＶＭＣＡＧＡＭＶＨＳＲＩＧＲＶＶＦＧＡＲＤＡＫＴＧＡＡＧＳＬＩＤＶＬＨＨＰＧＭＮＨＲＶＥＩＩＥＧＶＬＲＤＥＣＡＴＬＬＳＤＦＦＲＭＲＲＱＥＩＫＡＬＫＫＡＤＲＡＥＧＡＧＰＡＶ（配列番号７８）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０１６６】
場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下のシェワネラ・プトレファシエンス（Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｐｕｔｒｅｆａｃｉｅｎｓ）ＴａｄＡアミノ酸配列：ＭＤＥＹＷＭＱＶＡＭＱＭＡＥＫＡＥＡＡＧＥＶＰＶＧＡＶＬＶＫＤＧＱＱＩＡＴＧＹＮＬＳＩＳＱＨＤＰＴＡＨＡＥＩＬＣＬＲＳＡＧＫＫＬＥＮＹＲＬＬＤＡＴＬＹＩＴＬＥＰＣＡＭＣＡＧＡＭＶＨＳＲＩＡＲＶＶＹＧＡＲＤＥＫＴＧＡＡＧＴＶＶＮＬＬＱＨＰＡＦＮＨＱＶＥＶＴＳＧＶＬＡＥＡＣＳＡＱＬＳＲＦＦＫＲＲＲＤＥＫＫＡＬＫＬＡＱＲＡＱＱＧＩＥ（配列番号７９）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０１６７】

場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下のインフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）Ｆ３０３１　ＴａｄＡアミノ酸配列：ＭＤＡＡＫＶＲＳＥＦＤＥＫＭＭＲＹＡＬＥＬＡＤＫＡＥＡＬＧＥＩＰＶＧＡＶＬＶＤＤＡＲＮＩＩＧＥＧＷＮＬＳＩＶＱＳＤＰＴＡＨＡＥＩＩＡＬＲＮＧＡＫＮＩＱＮＹＲＬＬＮＳＴＬＹＶＴＬＥＰＣＴＭＣＡＧＡＩＬＨＳＲＩＫＲＬＶＦＧＡＳＤＹＫＴＧＡＩＧＳＲＦＨＦＦＤＤＹＫＭＮＨＴＬＥＩＴＳＧＶＬＡＥＥＣＳＱＫＬＳ　ＴＦＦＱＫＲＲＥＥＫＫＩＥＫＡＬＬＫＳＬＳＤＫ（配列番号８０）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１６８】

場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下のカウロバクター・クレセンタス（Ｃａｕｌｏｂａｃｔｅｒ　ｃｒｅｓｃｅｎｔｕｓ）ＴａｄＡアミノ酸配列：ＭＲＴＤＥＳＥＤＱＤＨＲＭＭＲＬＡＬＤＡＡＲＡＡＡＥＡＧＥＴＰＶＧＡＶＩＬＤＰＳＴＧＥＶＩＡＴＡＧＮＧＰＩＡＡＨＤＰＴＡＨＡＥＩＡＡＭＲＡＡＡＡＫＬＧＮＹＲＬＴＤＬＴＬＶＶＴＬＥＰＣＡＭＣＡＧＡＩＳＨＡＲＩＧＲＶＶＦＧＡＤＤＰＫＧＧＡＶＶＨＧＰＫＦＦＡＱＰＴＣＨＷＲＰＥＶＴＧＧＶＬＡＤＥＳＡＤＬＬＲＧＦＦＲＡＲＲＫＡＫＩ（配列番号８１）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１６９】

場合によっては、好適なアデノシンデアミナーゼは、以下のゲオバクター・スルフレデュセンス（Ｇｅｏｂａｃｔｅｒ　ｓｕｌｆｕｒｒｅｄｕｃｅｎｓ）ＴａｄＡアミノ酸配列：ＭＳＳＬＫＫＴＰＩＲＤＤＡＹＷＭＧＫＡＩＲＥＡＡＫＡＡＡＲＤＥＶＰＩＧＡＶＩＶＲＤＧＡＶＩＧＲＧＨＮＬＲＥＧＳＮＤＰＳＡＨＡＥＭＩＡＩＲＱＡＡＲＲＳＡＮＷＲＬＴＧＡＴＬＹＶＴＬＥＰＣＬＭＣＭＧＡＩＩＬＡＲＬＥＲＶＶＦＧＣＹＤＰＫＧＧＡＡＧＳＬＹＤＬＳＡＤＰＲＬＮＨＱＶＲＬＳＰＧＶＣＱＥＥＣＧＴＭＬＳＤＦＦＲＤＬＲＲＲＫＫＡＫＡＴＰＡＬＦＩＤＥＲＫＶＰＰＥＰ（配列番号８２）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７０】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクターポリペプチド融合ポリペプチドに含めるのに好適なシチジンデアミナーゼには、ＤＮＡ中のシチジンを脱アミノ化することができる任意の酵素が含まれる。

【０１７１】

場合によっては、シチジンデアミナーゼは、デアミナーゼのアポリポタンパク質Ｂ　ｍＲＮＡ編集複合体（ＡＰＯＢＥＣ）ファミリー由来のデアミナーゼである。場合によっては、ＡＰＯＢＥＣファミリーデアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ１デアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ２デアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ３Ａデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｂデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｃデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｄデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｆデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｇデアミナーゼ、及びＡＰＯＢＥＣ３Ｈデアミナーゼからなる群から選択される。場合によっては、シチジンデアミナーゼは、活性化誘導デアミナーゼ（ＡＩＤ）である。

【０１７２】

場合によっては、好適なシチジンデアミナーゼは、以下のアミノ酸配列：ＭＤＳＬＬＭＮＲＲＫＦＬＹＱＦＫＮＶＲＷＡＫＧＲＲＥＴＹＬＣＹＶＶＫＲＲＤＳＡＴＳＦＳＬＤＦＧＹＬＲＮＫＮＧＣＨＶＥＬＬＦＬＲＹＩＳＤＷＤＬＤＰＧＲＣＹＲＶＴＷＦＴＳＷＳＰＣＹＤＣＡＲＨＶＡＤＦＬＲＧＮＰＮＬＳＬＲＩＦＴＡＲＬＹＦＣＥＤＲＫＡＥＰＥＧＬＲＲＬＨＲＡＧＶＱＩＡＩＭＴＦＫＤＹＦＹＣＷＮＴＦＶＥＮＨＥＲＴＦＫＡＷＥＧＬＨＥＮＳＶＲＬＳＲＱＬＲＲＩＬＬＰＬＹＥＶＤＤＬＲＤＡＦＲＴＬＧＬ（配列番号８３）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、

少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７３】

場合によっては、好適なシチジンデアミナーゼは、ＡＩＤであり、以下のアミノ酸配列：ＭＤＳＬＬＭＮＲＲＫ　ＦＬＹＱＦＫＮＶＲＷ　ＡＫＧＲＲＥＴＹＬＣ　ＹＶＶＫＲＲＤＳＡＴ　ＳＦＳＬＤＦＧＹＬＲ　ＮＫＮＧＣＨＶＥＬＬ　ＦＬＲＹＩＳＤＷＤＬ　ＤＰＧＲＣＹＲＶＴＷ　ＦＴＳＷＳＰＣＹＤＣ　ＡＲＨＶＡＤＦＬＲＧ　ＮＰＮＬＳＬＲＩＦＴ　ＡＲＬＹＦＣＥＤＲＫ　ＡＥＰＥＧＬＲＲＬＨ　ＲＡＧＶＱＩＡＩＭＴ　ＦＫＥＮＨＥＲＴＦＫ　ＡＷＥＧＬＨＥＮＳＶ　ＲＬＳＲＱＬＲＲＩＬ　ＬＰＬＹＥＶＤＤＬＲ　ＤＡＦＲＴＬＧＬ（配列番号８４）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７４】

場合によっては、好適なシチジンデアミナーゼは、ＡＩＤであり、以下のアミノ酸配列：ＭＤＳＬＬＭＮＲＲＫ　ＦＬＹＱＦＫＮＶＲＷ　ＡＫＧＲＲＥＴＹＬＣ　ＹＶＶＫＲＲＤＳＡＴ　ＳＦＳＬＤＦＧＹＬＲ　ＮＫＮＧＣＨＶＥＬＬ　ＦＬＲＹＩＳＤＷＤＬ　ＤＰＧＲＣＹＲＶＴＷ　ＦＴＳＷＳＰＣＹＤＣ　ＡＲＨＶＡＤＦＬＲＧ　ＮＰＮＬＳＬＲＩＦＴ　ＡＲＬＹＦＣＥＤＲＫ　ＡＥＰＥＧＬＲＲＬＨ　ＲＡＧＶＱＩＡＩＭＴ　ＦＫＤＹＦＹＣＷＮＴ　ＦＶＥＮＨＥＲＴＦＫ　ＡＷＥＧＬＨＥＮＳＶ　ＲＬＳＲＱＬＲＲＩＬ　ＬＰＬＹＥＶＤＤＬＲ　ＤＡＦＲＴＬＧＬ（配列番号８５）に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７５】

転写因子

場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、ｉｉ）異種ポリペプチド（「融合パートナー」）とを含み、ここで、異種ポリペプチドは、転写因子である。転写因子は、ｉ）ＤＮＡ結合ドメインと、ｉｉ）転写アクティベーターとを含み得る。転写因子は、ｉ）ＤＮＡ結合ドメインと、ｉｉ）転写リプレッサーとを含み得る。好適な転写因子は、転写アクティベーターまたは転写リプレッサードメイン（例えば、Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢまたはＳＫＤ）、Ｍａｄ　ｍＳＩＮ３相互作用ドメイン（ＳＩＤ）、ＥＲＦリプレッサードメイン（ＥＲＤ）等）、亜鉛フィンガーベースの人工転写因子（例えば、Ｓｅｒａ（２００９）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．６１：５１３を参照されたい）、ＴＡＬＥベースの人工転写因子（例えば、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ１４：７８１を参照されたい）等を含むポリペプチドを含む。場合によっては、転写因子は、ＶＰ６４ポリペプチド（転写活性化）を含む。場合によっては、転写因子は、Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ポリペプチド（転写抑制）を含む。場合によっては、転写因子は、Ｍａｄ　ｍＳＩＮ３相互作用ドメイン（ＳＩＤ）ポリペプチド（転写抑制）を含む。場合によっては、転写因子は、ＥＲＦリプレッサードメイン（ＥＲＤ）ポリペプチド（転写抑制）を含む。例えば、場合によっては、転写因子は、転写アクティベーターであり、ここで、転写アクティベーターは、ＧＡＬ４－ＶＰ１６である。

【０１７６】

リコンビナーゼ

場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、ｉｉ）異種ポリペプチド（「融合パートナー」）とを含み、ここで、異種ポリペプチドは、リコンビナーゼである。好適なリコンビナーゼとしては、例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ、ＦＬＰリコンビナーゼ等が挙げられる。

【０１７７】

対象の融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに対する様々な追加の好適な異種ポリペプチド（

またはその断片）の例としては、以下の出願（それらの公報は、Ｃａｓ９等の他のＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼに関するが、記載される融合パートナーはまた、代わりにＣａｓ１２Ｌと共に使用することもできる）：ＰＣＴ特許出願：ＷＯ２０１００７５３０３、ＷＯ２０１２０６８６２７、及びＷＯ２０１３１５５５５５に記載されるもの、ならびに、例えば、米国特許及び特許出願８，９０６，６１６、８，８９５，３０８、８，８８９，４１８、８，８８９，３５６、８，８７１，４４５、８，８６５，４０６、８，７９５，９６５、８，７７１，９４５、８，６９７，３５９、２０１４００６８７９７、２０１４０１７０７５３、２０１４０１７９００６、２０１４０１７９７７０、２０１４０１８６８４３、２０１４０１８６９１９、２０１４０１８６９５８、２０１４０１８９８９６、２０１４０２２７７８７、２０１４０２３４９７２、２０１４０２４２６６４、２０１４０２４２６９９、２０１４０２４２７００、２０１４０２４２７０２、２０１４０２４８７０２、２０１４０２５６０４６、２０１４０２７３０３７、２０１４０２７３２２６、２０１４０２７３２３０、２０１４０２７３２３１、２０１４０２７３２３２、２０１４０２７３２３３、２０１４０２７３２３４、２０１４０２７３２３５、２０１４０２８７９３８、２０１４０２９５５５６、２０１４０２９５５５７、２０１４０２９８５４７、２０１４０３０４８５３、２０１４０３０９４８７、２０１４０３１０８２８、２０１４０３１０８３０、２０１４０３１５９８５、２０１４０３３５０６３、２０１４０３３５６２０、２０１４０３４２４５６、２０１４０３４２４５７、２０１４０３４２４５８、２０１４０３４９４００、２０１４０３４９４０５、２０１４０３５６８６７、２０１４０３５６９５６、２０１４０３５６９５８、２０１４０３５６９５９、２０１４０３５７５２３、２０１４０３５７５３０、２０１４０３６４３３３、及び２０１４０３７７８６８（これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に見出され得るものが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７８】

場合によっては、異種ポリペプチド（融合パートナー）は、細胞内局在を提供し、すなわち、異種ポリペプチドは、細胞内局在配列（例えば、核へと標的指向させるための核局在シグナル（ＮＬＳ）、融合タンパク質を核外に保つ配列、例えば、核外搬出配列（ＮＥＳ）、融合タンパク質を細胞質中に保持したままにする配列、ミトコンドリアへと標的指向させるためのミトコンドリア局在シグナル、葉緑体へと標的指向させるための葉緑体局在シグナル、ＥＲ保持シグナル等）を含有する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドはＮＬＳを含まないため、タンパク質は核へと標的指向化されない（これは、例えば、標的核酸が、サイトゾル中に存在するＲＮＡである場合に、有利であり得る）。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドは、追跡及び／または精製を容易にするためのタグを提供することができる（すなわち、異種ポリペプチドは、検出可能な標識である）（例えば、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＹＦＰ、ＲＦＰ、ＣＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ等；ヒスチジンタグ、例えば、６ＸＨｉｓタグ；ヘマグルチニン（ＨＡ）タグ；ＦＬＡＧタグ；Ｍｙｃタグ等）。

【０１７９】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、バリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、ｄＣａｓ１２Ｌタンパク質等）は、核局在化シグナル（ＮＬＳ）（例えば、場合によっては、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のＮＬＳ）を含む（それと融合されている）。したがって、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、１つ以上のＮＬＳ（例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のＮＬＳ）を含む。場合によっては、１つ以上のＮＬＳ（２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のＮＬＳ）は、Ｎ末端及び／またはＣ末端またはそれらの付近（例えば、それらの５０アミノ酸以内）に位置付けられる。場合によっては、１つ以上のＮＬＳ（２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のＮＬＳ）は、Ｎ末端またはその付近（例えば、その５０アミノ酸以内）に位置付けられる。場合によっては、１つ以上のＮＬＳ（２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のＮＬＳ）は、Ｃ末端またはその付近（例えば、その５０アミノ酸以内）に位置付け

られる。場合によっては、１つ以上のＮＬＳ（３つ以上、４つ以上、または５つ以上のＮＬＳ）は、Ｎ末端及びＣ末端の両方またはそれらの付近（例えば、それらの５０アミノ酸以内）に位置付けられる。場合によっては、あるＮＬＳがＮ末端に位置付けられ、あるＮＬＳがＣ末端に位置付けられる。

【０１８０】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、バリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、ｄＣａｓ１２Ｌタンパク質等）は、１～１０個のＮＬＳ（例えば、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、または２～５個のＮＬＳ）を含む（それと融合されている）。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、バリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、ｄＣａｓ１２Ｌタンパク質等）は、２～５個のＮＬＳ（例えば、２～４または２～３個のＮＬＳ）を含む（それと融合されている）。

【０１８１】

ＮＬＳの非限定な例としては、アミノ酸配列ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号８６）を有するＳＶ４０ウイルスラージＴ抗原のＮＬＳ；ヌクレオプラスミン由来のＮＬＳ（例えば、配列ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号８７）を有するヌクレオプラスミン二連ＮＬＳ）；アミノ酸配列ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号８８）またはＲＱＲＲＮＥＬＫＲＳＰ（配列番号８９）を有するｃ－ｍｙｃ　ＮＬＳ；配列ＮＱＳＳＮＦＧＰＭＫＧＧＮＦＧＧＲＳＳＧＰＹＧＧＧＧＱＹＦＡＫＰＲＮＱＧＧＹ（配列番号９０）を有するｈＲＮＰＡ１　Ｍ９　ＮＬＳ；インポーチン－アルファ由来のＩＢＢドメインの配列ＲＭＲＩＺＦＫＮＫＧＫＤＴＡＥＬＲＲＲＲＶＥＶＳＶＥＬＲＫＡＫＫＤＥＱＩＬＫＲＲＮＶ（配列番号９１）；筋腫Ｔタンパク質の配列ＶＳＲＫＲＰＲＰ（配列番号９２）及びＰＰＫＫＡＲＥＤ（配列番号９３）；ヒトｐ５３の配列ＰＱＰＫＫＫＰＬ（配列番号９４）；マウスｃ－ａｂｌ　ＩＶの配列ＳＡＬＩＫＫＫＫＫＭＡＰ（配列番号９５）；インフルエンザウイルスＮＳ１の配列ＤＲＬＲＲ（配列番号９６）及びＰＫＱＫＫＲＫ（配列番号９７）；肝炎ウイルスデルタ抗原の配列ＲＫＬＫＫＫＩＫＫＬ（配列番号９８）；マウスＭｘ１タンパク質の配列ＲＥＫＫＫＦＬＫＲＲ（配列番号９９）；ヒトポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼの配列ＫＲＫＧＤＥＶＤＧＶＤＥＶＡＫＫＫＳＫＫ（配列番号１００）；ならびにステロイドホルモン受容体（ヒト）グルココルチコイドの配列ＲＫＣＬＱＡＧＭＮＬＥＡＲＫＴＫＫ（配列番号１０１）に由来するＮＬＳ配列が挙げられる。一般的に、ＮＬＳ（または複数のＮＬＳ）は、真核細胞の核内で検出可能な量のＣａｓ１２Ｌタンパク質の蓄積を駆動するのに十分な強度のものである。核内の蓄積の検出は、任意の好適な技法によって実施され得る。例えば、検出可能なマーカーが、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質と融合されてもよく、それにより細胞内の位置が可視化され得る。また、細胞核が細胞から単離されてもよく、次いで、その内容物が、タンパク質を検出するための任意の好適なプロセス、例えば、免疫組織化学、ウェスタンブロット、または酵素活性アッセイによって分析されてもよい。核内の蓄積はまた、間接的に決定されてもよい。

【０１８２】

場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、「タンパク質形質導入ドメイン」またはＰＴＤ（ＣＰＰ－細胞透過性ペプチドとしても知られる）を含み、これはポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、または脂質二層、ミセル、細胞膜、細胞小器官膜、もしくは小胞膜の横断を容易にする有機もしくは無機化合物を指す。小さな極性分子から大きな高分子の範囲であり得る別の分子、及び／またはナノ粒子に結合したＰＴＤは、例えば、細胞外空間から細胞内空間に、またはサイトゾルから細胞小器官内に移動する分子の膜横断を容易にする。いくつかの実施形態では、ＰＴＤは、ポリペプチドのアミノ酸末端に共有結合している（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドと連結されて融合タンパク質を作製するか、またはバリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質、例えば、ｄＣａｓ１２Ｌ、ニッカーゼＣａｓ１２Ｌ、もしくは融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質と連結されて融合タンパク質を作製する）。いくつかの実施形態では、ＰＴＤは、ポリペプチドのカルボキシ

ル末端に共有結合している（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌと連結されて融合タンパク質を作製するか、またはバリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質、例えば、ｄＣａｓ１２Ｌ、ニッカーゼＣａｓ１２Ｌ、もしくは融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質と連結されて融合タンパク質を作製する）。場合によっては、ＰＴＤは、好適な挿入部位でＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドの内部に挿入される（すなわち、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端にない）。場合によっては、対象のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、１つ以上のＰＴＤ（例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上のＰＴＤ）を含む（それにコンジュゲートされている、それと融合されている）。場合によっては、ＰＴＤは、核局在化シグナル（ＮＬＳ）（例えば、場合によっては、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のＮＬＳ）を含む。したがって、場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、１つ以上のＮＬＳ（例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のＮＬＳ）を含む。いくつかの実施形態において、ＰＴＤは、核酸（例えば、Ｃａｓ１２Ｌガイド核酸、Ｃａｓ１２Ｌガイド核酸をコードするポリヌクレオチド、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド等）に共有結合している。ＰＴＤの例としては、最小ウンデカペプチドタンパク質形質導入ドメイン（ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４０）を含むＨＩＶ－１　ＴＡＴの残基４７～５７に対応する）；細胞中への直接進入に十分ないくつかのアルギニン（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１０～５０個のアルギニン）を含むポリアルギニン配列；ＶＰ２２ドメイン（Ｚｅｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．９（６）：４８９－９６）；ショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）アンテナペディアタンパク質形質導入ドメイン（Ｎｏｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｄｉａｂｅｔｅｓ　５２（７）：１７３２－１７３７）；切断型ヒトカルシトニンペプチド（Ｔｒｅｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２１：１２４８－１２５６）；ポリリジン（Ｗｅｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：１３００３－１３００８）；ＲＲＱＲＲＴＳＫＬＭＫＲ（配列番号４１）；トランスポータンＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＧＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（配列番号４２）；ＫＡＬＡＷＥＡＫＬＡＫＡＬＡＫＡＬＡＫＨＬＡＫＡＬＡＫＡＬＫＣＥＡ（配列番号４３）；及びＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（配列番号４４）が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なＰＴＤとしては、ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４０）、ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４５）；３個のアルギニン残基～５０個のアルギニン残基のアルギニンホモポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なＰＴＤドメインのアミノ酸配列としては、以下、すなわちＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４０）、ＲＫＫＲＲＱＲＲ（配列番号４６）、ＹＡＲＡＡＡＲＱＡＲＡ（配列番号４７）、ＴＨＲＬＰＲＲＲＲＲＲ（配列番号４８）、及びＧＧＲＲＡＲＲＲＲＲＲ（配列番号４９）のうちのいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＰＴＤは、活性化可能なＣＰＰ（ＡＣＰＰ）である（Ａｇｕｉｌｅｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｉｎｔｅｇｒ　Ｂｉｏｌ（Ｃａｍｂ）Ｊｕｎｅ；１（５－６）：３７１－３８１）。ＡＣＰＰは、切断可能なリンカーを介して、一致するポリアニオン（例えば、Ｇｌｕ９または「Ｅ９」）につなげられたポリカチオン性ＣＰＰ（例えば、Ａｒｇ９または「Ｒ９」）を含み、これは正味電荷をほぼ０に還元し、それによって細胞への付着及び取り込みを阻害する。リンカーの切断時に、ポリアニオンが放出され、ポリアルギニン及びその本来の付着性を局所的にマスク解除し、このようにしてＡＣＰＰを「活性化して」膜を横断するようにする。

【０１８３】

リンカー（例えば、融合パートナーのための）

いくつかの実施形態では、対象のＣａｓ１２Ｌタンパク質は、リンカーポリペプチド（例えば、１つ以上のリンカーポリペプチド）を介して融合パートナーと融合され得る。リンカーポリペプチドは、様々なアミノ酸配列のうちのいずれかを有し得る。タンパク質は、一般に柔軟な性質のスペーサーペプチドによってつなげられ得るが、他の化学結合も除外されない。好適なリンカーとしては、４アミノ酸～４０アミノ酸長、または４アミノ酸

～２５アミノ酸長のポリペプチドが挙げられる。これらのリンカーは、リンカーをコードする合成オリゴヌクレオチドを使用してタンパク質をカップリングすることによって生成され得るか、または融合タンパク質をコードする核酸配列によってコードされ得る。ある程度の柔軟性を有するペプチドリンカーを使用することができる。好ましいリンカーが、一般に柔軟なペプチドをもたらす配列を有することを念頭において、連結ペプチドは、事実上任意のアミノ酸配列を有し得る。グリシン及びアラニン等の小さなアミノ酸の使用は、柔軟なペプチドを作成する際に有用である。そのような配列の作成は、当業者にとって慣例である。様々な異なるリンカーが市販されており、使用に好適であると見なされる。

【０１８４】

リンカーポリペプチドの例としては、グリシンポリマー（Ｇ）$_n$、グリシン－セリンポリマー（例えば、（ＧＳ）$_n$、ＧＳＧＧＳ$_n$（配列番号５０）、ＧＧＳＧＧＳ$_n$（配列番号５１）、及びＧＧＧＳ$_n$（配列番号５２）を含み、配列中、ｎは、少なくとも１の整数である）、グリシン－アラニンポリマー、アラニン－セリンポリマーが挙げられる。例示的なリンカーは、ＧＧＳＧ（配列番号５３）、ＧＧＳＧＧ（配列番号５４）、ＧＳＧＳＧ（配列番号５５）、ＧＳＧＧＧ（配列番号５６）、ＧＧＧＳＧ（配列番号５７）、ＧＳＳＳＧ（配列番号５８）等を含むがこれらに限定されない、アミノ酸配列を含み得る。当業者であれば、任意の所望のエレメントにコンジュゲートされたペプチドの設計が、全てまたは部分的に柔軟であるリンカーを含み得、それによりリンカーが、柔軟なリンカーならびに柔軟性の低い構造を付与する１つ以上の部分を含み得ることを認識するであろう。

【０１８５】

検出可能な標識

場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、検出可能な標識を含む。検出可能なシグナルを提供することができる好適な検出可能な標識及び／または部分としては、酵素、放射性同位体、特異的結合対のメンバー、フルオロフォア、蛍光タンパク質、量子ドット等が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【０１８６】

好適な蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）またはそのバリアント、ＧＦＰの青色蛍光バリアント（ＢＦＰ）、ＧＦＰのシアン蛍光バリアント（ＣＦＰ）、ＧＦＰの黄色蛍光バリアント（ＹＦＰ）、高感度ＧＦＰ（ＥＧＦＰ）、高感度ＣＦＰ（ＥＣＦＰ）、高感度ＹＦＰ（ＥＹＦＰ）、ＧＦＰＳ６５Ｔ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ｔｏｐａｚ（ＴＹＦＰ）、Ｖｅｎｕｓ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、ＧＦＰｕｖ、不安定化ＥＧＦＰ（ｄＥＧＦＰ）、不安定化ＥＣＦＰ（ｄＥＣＦＰ）、不安定化ＥＹＦＰ（ｄＥＹＦＰ）、ｍＣＦＰｍ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ＣｙＰｅｔ、ＹＰｅｔ、ｍＫＯ、ＨｃＲｅｄ、ｔ－ＨｃＲｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－単量体、Ｊ－Ｒｅｄ、二量体２、ｔ－二量体２（１２）、ｍＲＦＰ１、ポシロポリン（ｐｏｃｉｌｌｏｐｏｒｉｎ）、ウミシイタケ（Ｒｅｎｉｌｌａ）ＧＦＰ、Ｍｏｎｓｔｅｒ ＧＦＰ、ｐａＧＦＰ、Ｋａｅｄｅタンパク質及びキンドリングタンパク質、フィコビリンタンパク質、ならびにＢ－フィコエリトリン、Ｒ－フィコエリトリン、及びアロフィコシアニンを含むフィコビリンタンパク質コンジュゲートが挙げられるが、これらに限定されない。蛍光タンパク質の他の例としては、ｍＨｏｎｅｙｄｅｗ、ｍＢａｎａｎａ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｄＴｏｍａｔｏ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＧｒａｐｅ１、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＧｒａｐｅ２、ｍＰｌｕｍ（Ｓｈａｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２：９０５－９０９）等が挙げられる。例えば、Ｍａｔｚ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１７：９６９－９７３に記載されるような、花虫類種由来の様々な蛍光及び染色タンパク質のうちのいずれかが使用に好適である。

【０１８７】

好適な酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）、ベーターガラクトシダーゼ（ＧＡＬ）、グルコース－６－ホスファターゼデヒドロゲナーゼ、ベーターＮ－アセチルグルコサミニダーゼ、β－グルクロニダーゼ、転

化酵素、キサンチンオキシダーゼ、ホタルルシフェラーゼ、グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８８】

プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）

Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、ＤＮＡ標的指向ＲＮＡと標的ＤＮＡとの間の相補性の領域によって定義される標的配列において、標的ＤＮＡに結合する。多くのＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼの場合と同様に、二本鎖標的ＤＮＡの部位特異的結合（及び／または切断）は、（ｉ）ガイドＲＮＡと標的ＤＮＡとの間の塩基対合相補性、及び（ｉｉ）標的ＤＮＡ中の短いモチーフ［プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）と称される］の両方によって決定される位置において生じる。

【０１８９】

場合によっては、Ｃａｓ１２ＬタンパクのＰＡＭは、標的ＤＮＡの非相補鎖の標的配列の直ぐ５’側にある（相補鎖は、（ｉ）ガイドＲＮＡのガイド配列にハイブリダイズし、一方、非相補鎖は、ガイドＲＮＡに直接ハイブリダイズしない、かつ（ｉｉ）非相補鎖の逆相補鎖である）。

【０１９０】

場合によっては、異なるＣａｓ１２Ｌタンパク質（すなわち、様々な種に由来するＣａｓ１２Ｌタンパク質）が、異なるＣａｓ１２Ｌタンパク質の様々な酵素的特徴を利用するために（例えば、異なるＰＡＭ配列選好性のため；増加または減少した酵素活性のため；増加または減少したレベルの細胞毒性のため；ＮＨＥＪ、ホモロジー配向型修復、一本鎖切断、二本鎖切断等の間の均衡を変更するため；短い全配列を利用するため等）、様々な提供される方法における使用に有利であり得る。異なる種に由来するＣａｓ１２Ｌタンパク質は、標的ＤＮＡ中に異なるＰＡＭ配列を必要とし得る。適切なＰＡＭ配列の特定のための様々な方法（インシリコ及び／またはウェットラボ法を含む）が当該技術分野で既知かつ慣例であり、任意の簡便な方法を使用することができる。

【０１９１】

実施例１に示されるように、本開示のＣａｌ１２Ｌポリペプチドは、ガイドＲＮＡの標的指向セグメントに相補的である標的核酸（例えば、標的ＤＮＡ）の任意の配列を切断するように再プログラムされ得（ガイドＲＮＡと複合体を形成することによって）、ここで、ＰＡＭは、標的の５’末端上に存在し（例えば、Ｃａｓλ１の場合はＴリッチＰＡＭ）、インビボでの機能的エフェクターの形成のために追加のＲＮＡ構成要素は必要とされない。場合によっては、ＰＡＭ配列は、Ｔリッチ配列（例えば、ＴＴＲ（ここで、Ｒはプリンである））である。場合によっては、ＰＡＭ配列は、ＴＴＡである。場合によっては、ＰＡＭ配列は、ＴＴＧである。

【０１９２】

Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ

Ｃａｓ１２Ｌタンパク質に結合して、リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）を形成し、かつその複合体を標的核酸（例えば、標的ＤＮＡ）内の特定の位置へと標的指向させる核酸は、本明細書において「Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ」または単に「ガイドＲＮＡ」と称される。場合によっては、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡは、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡがＲＮＡ塩基に加えてＤＮＡ塩基を含むように作製され得るが、本明細書においてそのような分子を包含するように「Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ」という用語が依然として使用されることを理解されたい。

【０１９３】

Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、標的指向セグメント及びタンパク質結合セグメントの２つのセグメントを含むと言うことができる。タンパク質結合セグメントはまた、本明細書において、ガイドＲＮＡの「定常領域」とも称される。Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの標的指向セグメントは、標的核酸（例えば、標的ｄｓＤＮＡ、標的ｓｓＲＮＡ、標的ｓｓＤＮＡ、二本鎖標的ＤＮＡの相補鎖等）内の特定の配列（標的部位）に相補的な（したがってそれとハイブリダイズする）ヌクレオチド配列（ガイド配列）を含む。タンパク質結合セ

グメント（または「タンパク質結合配列」）は、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドと相互作用する（それに結合する）。対象のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いにハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ二重鎖（ｄｓＲＮＡ二重鎖）を形成するヌクレオチドの２つの相補性ストレッチを含み得る。標的核酸（例えば、ゲノムＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ＲＮＡ等）の部位特異的結合及び／または切断は、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡのガイド配列）と標的核酸との間の塩基対合相補性によって決定される位置（例えば、標的座位の標的配列）で生じ得る。

【０１９４】

ＣａｓＬガイドＲＮＡ及びＣａｓ１２Ｌタンパク質（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、バリアントＣａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド等）は、複合体を形成する（例えば、非共有結合性の相互作用を介して結合する）。Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、ガイド配列（標的核酸の配列に対して相補的なヌクレオチド配列）を含む、標的指向セグメントを含むことによって、複合体に標的特異性を提供する。複合体のＣａｓ１２Ｌタンパク質は、部位特異的活性（例えば、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質によって提供される切断活性及び／または融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質の場合には融合パートナーによって提供される活性）を提供する。換言すれば、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡとのその会合によって、標的核酸配列（例えば、標的配列）に誘導される。

【０１９５】

Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの「標的指向配列」とも称される「ガイド配列」は、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質（例えば、天然型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド等）を、任意の所望の標的核酸の任意の所望の配列へと標的指向させることができるように改変され得るが、ただし、（例えば、本明細書に記載されるように）ＰＡＭ配列が考慮され得ることを例外とする。したがって、例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、真核細胞中の核酸、例えば、ウイルス核酸、真核細胞核酸（例えば、真核細胞染色体、染色体配列、真核細胞ＲＮＡ等）において、配列に対する相補性を有するガイド配列を有することができる（例えば、それとハイブリダイズすることができる）。

【０１９６】

Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡのガイド配列

対象のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、標的核酸中の配列（標的部位）に対して相補的なヌクレオチド配列である、ガイド配列（すなわち、標的指向配列）を含む。換言すれば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡのガイド配列は、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）を介して配列特異的な様態で標的核酸（例えば、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）、または二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ））と相互作用し得る。Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡのガイド配列は、標的核酸（例えば、ゲノムＤＮＡ等の真核細胞の標的核酸）内で任意の所望の標的配列にハイブリダイズするように改変（例えば、遺伝子操作によって）／設計され得る（例えば、ＰＡＭを考慮に入れながら、例えば、ｄｓＤＮＡ標的を標的とするとき）。

【０１９７】

場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、６０％以上（例えば、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、８０％以上（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、９０％以上（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１００％である。

【０１９８】

場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、標的核酸の標的部位の７つの連続した３’最端ヌクレオチドにわたって１００％である。

【０１９９】

場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１７個以上（例えば、１８個以上、１９個以上、２０個以上、２１個以上、２２個以上）の連続したヌクレオチドにわたって６０％以上（例えば、７０％以上、７５％個以上、８０％個以上、８５％個以上、９０％個以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１７個以上（例えば、１８個以上、１９個以上、２０個以上、２１個以上、２２個以上）の連続したヌクレオチドにわたって８０％以上（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１７個以上（例えば、１８個以上、１９個以上、２０個以上、２１個以上、２２個以上）の連続したヌクレオチドにわたって９０％以上（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１７個以上（例えば、１８個以上、１９個以上、２０個以上、２１個以上、２２個以上）の連続したヌクレオチドにわたって１００％である。

【０２００】

場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１９個以上（例えば、２０個以上、２１個以上、２２個以上）の連続したヌクレオチドにわたって６０％以上（例えば、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１９個以上（例えば、２０個以上、２１個以上、２２個以上）の連続したヌクレオチドにわたって８０％以上（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１９個以上（例えば、２０個以上、２１個以上、２２個以上）の連続したヌクレオチドにわたって９０％以上（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１９個以上（例えば、２０個以上、２１個以上、２２個以上）の連続したヌクレオチドにわたって１００％である。

【０２０１】

場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１７～２５個の連続したヌクレオチドにわたって６０％以上（例えば、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１７～２５個の連続したヌクレオチドにわたって８０％以上（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１７～２５個の連続したヌクレオチドにわたって９０％以上（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１７～２５個の連続したヌクレオチドにわたって１００％である。

【０２０２】

場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１９～２５個の連続したヌクレオチドにわたって６０％以上（例えば、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１９～２５個の連続したヌクレオチドにわたって８０％以上

（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１９～２５個の連続したヌクレオチドにわたって９０％以上（例えば、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）である。場合によっては、ガイド配列と標的核酸の標的部位との間の相補性パーセントは、１９～２５個の連続したヌクレオチドにわたって１００％である。

【０２０３】

場合によっては、ガイド配列は、１７～３０ヌクレオチド（ｎｔ）（例えば、１７～２５、１７～２２、１７～２０、１９～３０、１９～２５、１９～２２、１９～２０、２０～３０、２０～２５、または２０～２２ｎｔ）の範囲の長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、１７～２５ヌクレオチド（ｎｔ）（例えば、１７～２２、１７～２０、１９～２５、１９～２２、１９～２０、２０～２５、または２０～２２ｎｔ）の範囲の長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、１７ｎｔ以上（例えば、１８以上、１９以上、２０以上、２１以上、または２２ｎｔ以上；１９ｎｔ、２０ｎｔ、２１ｎｔ、２２ｎｔ、２３ｎｔ、２４ｎｔ、２５ｎｔ等）の長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、１９ｎｔ以上（例えば、２０以上、２１以上、または２２ｎｔ以上；１９ｎｔ、２０ｎｔ、２１ｎｔ、２２ｎｔ、２３ｎｔ、２４ｎｔ、２５ｎｔ等）の長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、１７ｎｔの長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、１８ｎｔの長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、１９ｎｔの長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、２０ｎｔの長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、２１ｎｔの長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、２２ｎｔの長さを有する。場合によっては、ガイド配列は、２３ｎｔの長さを有する。

【０２０４】

場合によっては、ガイド配列（「スペーサー配列」とも称される）は、１５～５０ヌクレオチド（例えば、１５ヌクレオチド（ｎｔ）～２０ｎｔ、２０ｎｔ～２５ｎｔ、２５ｎｔ～３０ｎｔ、３０ｎｔ～３５ｎｔ、３５ｎｔ～４０ｎｔ、４０ｎｔ～４５ｎｔ、または４５ｎｔ～５０ｎｔ）の長さを有する。

【０２０５】

ＣａｓｌｌＬガイドＲＮＡのタンパク質結合セグメント

対象のＣａｓｌｌＬガイドＲＮＡのタンパク質結合セグメント（「定常領域」）は、ＣａｓｌｌＬタンパク質と相互作用する。ＣａｓｌｌＬガイドＲＮＡは、結合したＣａｓｌｌＬタンパク質を、上述のガイド配列を介して標的核酸内の特定のヌクレオチド配列に誘導する。ＣａｓｌｌＬガイドＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いに対して相補的であり、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ二重鎖（ｄｓＲＮＡ二重鎖）を形成するヌクレオチドの２つのストレッチを含み得る。したがって、場合によっては、タンパク質結合セグメントは、ｄｓＲＮＡ二重鎖を含む。

【０２０６】

場合によっては、ｄｓＲＮＡ二重鎖領域は、５～２５塩基対（ｂｐ）（例えば、５～２２、５～２０、５～１８、５～１５、５～１２、５～１０、５～８、８～２５、８～２２、８～１８、８～１５、８～１２、１２～２５、１２～２２、１２～１８、１２～１５、１３～２５、１３～２２、１３～１８、１３～１５、１４～２５、１４～２２、１４～１８、１４～１５、１５～２５、１５～２２、１５～１８、１７～２５、１７～２２、または１７～１８ｂｐ、例えば、５ｂｐ、６ｂｐ、７ｂｐ、８ｂｐ、９ｂｐ、１０ｂｐ等）の範囲を含む。場合によっては、ｄｓＲＮＡ二重鎖領域は、６～１５塩基対（ｂｐ）（例えば、６～１２、６～１０、または６～８ｂｐ、例えば、６ｂｐ、７ｂｐ、８ｂｐ、９ｂｐ、１０ｂｐ等）の範囲を含む。場合によっては、二重鎖領域は、５以上のｂｐ（例えば、６以上、７以上、または８以上のｂｐ）を含む。場合によっては、二重鎖領域は、６以上のｂｐ（例えば、７以上、または８以上のｂｐ）を含む。場合によっては、二重鎖領域の全てのヌクレオチドが対合されるわけではなく、したがって、二重鎖形成領域は、バルジを含み得る。本明細書において、「バルジ」という用語は、二本鎖二重鎖に寄与しないが

、寄与するヌクレオチドによって５’及び３’を囲まれているヌクレオチド（１つのヌクレオチドであり得る）のストレッチを意味するように使用され、そのようなものとして、バルジは、二重鎖領域の一部と見なされる。場合によっては、ｄｓＲＮＡは、１つの以上のバルジ（例えば、２以上、３以上、４以上のバルジ）を含む。場合によっては、ｄｓＲＮＡ二重鎖は、２つ以上のバルジ（例えば、３つ以上、４つ以上のバルジ）を含む。場合によっては、ｄｓＲＮＡ二重鎖は、１～５つのバルジ（例えば、１～４、１～３、２～５、２～４、または２～３つのバルジ）を含む。

【０２０７】

したがって、場合によっては、互いにハイブリダイズしてｄｓＲＮＡ二重鎖を形成するヌクレオチドのストレッチは、互いに７０％～１００％の相補性（例えば、７５％～１００％、８０％～１０％、８５％～１００％、９０％～１００％、９５％～１００％の相補性）を有する。場合によっては、互いにハイブリダイズしてｄｓＲＮＡ二重鎖を形成するヌクレオチドのストレッチは、互いに７０％～１００％の相補性（例えば、７５％～１００％、８０％～１０％、８５％～１００％、９０％～１００％、９５％～１００％の相補性）を有する。場合によっては、互いにハイブリダイズしてｄｓＲＮＡ二重鎖を形成するヌクレオチドのストレッチは、互いに８５％～１００％の相補性（例えば、９０％～１００％、９５％～１００％の相補性）を有する。場合によっては、互いにハイブリダイズしてｄｓＲＮＡ二重鎖を形成するヌクレオチドのストレッチは、互いに７０％～９５％の相補性（例えば、７５％～９５％、８０％～９５％、８５％～９５％、９０％～９５％の相補性）を有する。

【０２０８】

換言すれば、いくつかの実施形態では、ｄｓＲＮＡ二重鎖は、互いに７０％～１００％の相補性（例えば、７５％～１００％、８０％～１０％、８５％～１００％、９０％～１００％、９５％～１００％の相補性）を有するヌクレオチドの２つのストレッチを含む。場合によっては、ｄｓＲＮＡ二重鎖は、互いに８５％～１００％の相補性（例えば、９０％～１００％、９５％～１００％の相補性）を有するヌクレオチドの２つのストレッチを含む。場合によっては、ヌクレオチドの２つのストレッチを含むｄｓＲＮＡ二重鎖は、互いに７０％～９５％の相補性（例えば、７５％～９５％、８０％～９５％、８５％～９５％、９０％～９５％の相補性）を有する。

【０２０９】

対象のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡの二重鎖領域は、天然型二重鎖領域に対して１つ以上（１つ、２つ、３つ、４つ、５つ等）の変異を含み得る。例えば、場合によっては、塩基対は維持され得るが、各セグメントからの塩基対に寄与するヌクレオチドは異なり得る。場合によっては、対象のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡの二重鎖領域は、（天然型Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの）天然型二重鎖領域と比較して、より多くの塩基対、より少ない塩基対、より小さなバルジ、より大きなバルジ、より少ないバルジ、より多くのバルジ、またはそれらの任意の簡便な組み合わせを含む。

【０２１０】

様々なＣａｓ９ガイドＲＮＡの例が、当該技術分野で見出され得、場合によっては、Ｃａｓ９ガイドＲＮＡに導入されたものと類似した変形もまた、本開示のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡに導入され得る（例えば、ｄｓＲＮＡ二重鎖領域に対する変異、別のタンパク質との相互作用を提供するために安定化を追加するための５’または３’末端の伸長等）。例えば、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１２ Ａｕｇ １７；３３７（６０９６）：８１６－２１、Ｃｈｙｌｉｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ Ｂｉｏｌ．２０１３ Ｍａｙ；１０（５）：７２６－３７、Ｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍｅｄ Ｒｅｓ Ｉｎｔ．２０１３；２０１３：２７０８０５、Ｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１３ Ｓｅｐ ２４；１１０（３９）：１５６４４－９、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｅｌｉｆｅ．２０１３；２：ｅ００４７１、Ｐａｔｔａｎａｙａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３ Ｓｅｐ；３１（９）：８３９－４３、Ｑｉ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｆｅｂ ２８；

１５２（５）：１１７３－８３、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｍａｙ ９；１５３（４）：９１０－８、Ａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２０１３ Ｏｃｔ ３１、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１３ Ｎｏｖ １；４１（２０）：ｅ１９、Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２０１３ Ｏｃｔ；２３（１０）：１１６３－７１、Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．２０１３ Ｎｏｖ；１９５（３）：１１７７－８０、ＤｉＣａｒｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１３ Ａｐｒ；４１（７）：４３３６－４３、Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１３ Ｏｃｔ；１０（１０）：１０２８－３４、Ｅｂｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｒｅｐ．２０１３；３：２５１０、Ｆｕｊｉｉ ｅｔ．ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１３ Ｎｏｖ １；４１（２０）：ｅ１８７、Ｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２０１３ Ｎｏｖ；２３（１１）：１３２２－５、Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１３ Ｎｏｖ １；４１（２０）：ｅ１８８、Ｌａｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３ Ｎｏｖ；８（１１）：２１８０－９６、Ｍａｌｉ ｅｔ．ａｔ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１３ Ｏｃｔ；１０（１０）：９５７－６３、Ｎａｋａｙａｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓｉｓ．２０１３Ｄｅｃ；５１（１２）：８３５－４３、Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３ Ｎｏｖ；８（１１）：２２８１－３０８、Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｓｅｐ １２；１５４（６）：１３８０－９、Ｕｐａｄｈｙａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｇ３（Ｂｅｔｈｅｓｄａ）．２０１３ Ｄｅｃ ９；３（１２）：２２３３－８、Ｗａｌｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１３ Ｓｅｐ ２４；１１０（３９）：１５５１４－５、Ｘｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｐｌａｎｔ．２０１３ Ｏｃｔ ９、Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｓｅｐ １２；１５４（６）：１３７０－９、Ｂｒｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２０１４ Ｏｃｔ ２３；５６（２）：３３３－９、ならびに米国特許及び特許出願８，９０６，６１６、８，８９５，３０８、８，８８９，４１８、８，８８９，３５６、８，８７１，４４５、８，８６５，４０６、８，７９５，９６５、８，７７１，９４５、８，６９７，３５９、２０１４００６８７９７、２０１４０１７０７５３、２０１４０１７９００６、２０１４０１７９７７０、２０１４０１８６８４３、２０１４０１８６９１９、２０１４０１８６９５８、２０１４０１８９８９６、２０１４０２２７７８７、２０１４０２３４９７２、２０１４０２４２６６４、２０１４０２４２６９９、２０１４０２４２７００、２０１４０２４２７０２、２０１４０２４８７０２、２０１４０２５６０４６、２０１４０２７３０３７、２０１４０２７３２２６、２０１４０２７３２３０、２０１４０２７３２３１、２０１４０２７３２３２、２０１４０２７３２３３、２０１４０２７３２３４、２０１４０２７３２３５、２０１４０２８７９３８、２０１４０２９５５５６、２０１４０２９５５５７、２０１４０２９８５４７、２０１４０３０４８５３、２０１４０３０９４８７、２０１４０３１０８２８、２０１４０３１０８３０、２０１４０３１５９８５、２０１４０３３５０６３、２０１４０３３５６２０、２０１４０３４２４５６、２０１４０３４２４５７、２０１４０３４２４５８、２０１４０３４９４００、２０１４０３４９４０５、２０１４０３５６８６７、２０１４０３５６９５６、２０１４０３５６９５８、２０１４０３５６９５９、２０１４０３５７５２３、２０１４０３５７５３０、２０１４０３６４３３３、及び２０１４０３７７８６８を参照されたく、これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に含まれる。

【０２１１】

Ｃａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡに含めるのに好適な定常領域の例が、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦ（例えば、配列中、ＴはＵで置換される）に提供される。Ｃａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡは、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか１つと比較して、１～５つのヌクレオチド置換を有する定常領域を含み得る。

【０２１２】

ヌクレオチド配列（ＴがＵで置換されている）は、１５～５０ヌクレオチド（例えば、１５ヌクレオチド（ｎｔ）～２０ｎｔ、２０ｎｔ～２５ｎｔ、２５ｎｔ～３０ｎｔ、３０ｎｔ～３５ｎｔ、３５ｎｔ～４０ｎｔ、４０ｎｔ～４５ｎｔ、または４５ｎｔ～５０ｎｔの長さ）である選択のスペーサー配列（ここで、スペーサー配列は、標的核酸結合配列（「ガイド配列」）を含む）と組み合わせることができる。場合によっては、スペーサー配列は、３５～３８ヌクレオチドの長さである。例えば、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示されるヌクレオチド配列（ＴがＵで置換されている）のうちのいずれか１つが、（Ｎ）ｎ定常領域を含むガイドＲＮＡに含まれ得、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～５０（例えば、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～３８、３５～４０、４０～４５、または４５～５０）の整数である。

【０２１３】

一例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＵＣＵＵＡＵＵＵＵＧＵＡＵＧＧＡＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号５９）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＧＡＣＣＵＣＵＵＵＵＵＡＵＡＡＧＧＡＵＵＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号６０；図２Ｂを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＵＡＵＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵＡＣＣＵＵＵＵＵＧＵＡＡＧＧＡＵＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６１；図２Ｐを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＡＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵＧＣＣＵＵＵＵＵＡＵＡＡＧＧＡＵＵＡＡＡＣＡＡＣＵＵＧ（配列番号６２；図２Ｔを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＡＡＡＵＡＧＵＡＣＵＵＵＵＡＵＡＧＵＣＵＡＵＡＵＡＣＡＡＣ（配列番号６３；図２ＢＢを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＵＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＵＣＵＵＡＵＵＵＵＧＵＡＵＧＧＡＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６４；図２ＣＣを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＵＵＵＵＡＵＵＵＵＧＵＡＵＧＧＡＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６５；図２ＴＴを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＡＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵＡＣＣＵＵＵＵＵＧＵＡＡＧＧＡＵＵＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号６６；図２ＷＷを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＵＡＣＵＡＵＵＵＵＧＵＡＡＡＧＵＡＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６７；図２ＸＸを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＡＵＧＵＵＧＵＡＧＡＵＧＣＣＵＵＵＵＵＡＵＡＡＧＧＡＵＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号６８；図２ＹＹを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＵＡＣＡＣＵＵＵＵＵＡＵＡＡＧＧＵＡＵＧＡＡＣＡＡＣ（配列番号６９；図２ＢＢＢを参照されたい）を含み得る。別の例として、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡの定常領域は、ヌクレオチド配列：ＡＵＵＧＵＵＧＵＡＡＣＡＵＣＵＡＵＵＵＵＧＵＡＡＧＧＵＧＵＡＡＡＣＡＡＣ（配列番号７０；図２ＫＫを参照されたい）を含み得る。

【０２１４】

図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される（ただし、ＴがＵで置換されている）ヌクレオチド配列のうちのいずれか１つの逆相補鎖が、定常領域（Ｎ）ｎを含むガイドＲＮＡに含まれ得、配列中、Ｎは、任意のヌクレオチドであり、ｎは、１５～５０（例えば、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～３８、３５～４０、４０～４５、または４５～５０）の整数である。一例として、ガイドＲＮＡは、以下のヌクレオチド配列：ＮＮＮ

は、任意のヌクレオチドであり、例えば、Ｎのストレッチは、標的核酸結合配列を含む。
【０２１５】
Ｃａｓ１２Ｌガイドポリヌクレオチド
場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質に結合して、核酸／Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド複合体を形成する、及びその複合体を標的核酸（例えば、標的ＤＮＡ）内の特定の位置へと標的指向させる核酸は、リボヌクレオチドのみ、デオキシリボヌクレオチドのみ、またはリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドとの混合物を含む。場合によっては、ガイドポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドのみを含み、本明細書において「ガイドＲＮＡ」と称される。場合によっては、ガイドポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドのみを含み、本明細書において「ガイドＤＮＡ」と称される。場合によっては、ガイドポリヌクレオチドは、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの両方を含む。ガイドポリヌクレオチドは、リボヌクレオチド塩基、デオキシリボヌクレオチド塩基、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド等の組み合わせを含み得、さらに、天然型骨格残基及び／または連結及び／または非天然型骨格残基及び／または連結を含み得る。
【０２１６】
Ｃａｓ１２Ｌシステム
本開示は、Ｃａｓ１２Ｌシステムを提供する。本開示のＣａｓ１２Ｌシステムは、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｂ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｃ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｄ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｅ）本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｆ）本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｇ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｈ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｊ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及びドナー鋳型核酸をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｋ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｌ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及びドナー鋳型核酸をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｍ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ｎ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ならびにドナー鋳型核酸、ｏ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ｐ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ならびにドナー鋳型核酸、ｑ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、第１のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及び第２のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、もしくはｒ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、第１のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及び第２のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ま

たは（ａ）～（ｒ）のうちの１つの何らかの変形を含み得る。
【０２１７】
核酸
本開示は、ドナーポリヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド（例えば、野生型Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、ニッカーゼＣａｓ１２Ｌタンパク質、ｄＣａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質等）をコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列のうちの１つ以上を含む、１つ以上の核酸を提供する。本開示は、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本開示は、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、組み換え発現ベクターを提供する。本開示は、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、組み換え発現ベクターを提供する。本開示は、ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（複数可）をコードするヌクレオチド配列とを含む、組み換え発現ベクターを提供する。本開示は、ａ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（複数可）をコードするヌクレオチド配列とを含む、組み換え発現ベクターを提供する。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質をコードするヌクレオチド配列及び／またはＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、選択の細胞型（例えば、原核細胞、真核細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、霊長類細胞、齧歯類細胞、ヒト細胞等）において作動可能であるプロモーターに作動可能に連結されている。
【０２１８】
場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、コドン最適化される。この種類の最適化は、同じタンパク質をコードしながら、意図した宿主生物または細胞のコドン選好性を模倣するように、Ｃａｓ１２Ｌコードヌクレオチド配列の変異を伴い得る。したがって、コドンは変更され得るが、コードされたタンパク質は、変更されないままである。例えば、意図した標的細胞がヒト細胞であった場合、ヒトコドン最適化Ｃａｓ１２Ｌコードヌクレオチド配列を使用することができる。別の非限定的な例として、意図した宿主細胞がマウス細胞であった場合、マウスコドン最適化Ｃａｓ１２Ｌコードヌクレオチド配列を作製することができる。別の非限定的な例として、意図した宿主細胞が植物細胞であった場合、植物コドン最適化Ｃａｓ１２Ｌコードヌクレオチド配列を作製することができる。別の非限定的な例として、意図した宿主細胞が昆虫細胞であった場合、昆虫コドン最適化Ｃａｓ１２Ｌコードヌクレオチド配列を作製することができる。
【０２１９】
コドン使用頻度表は、例えば、ｗｗｗ［ｄｏｔ］ｋａｚｕｓａ［ｄｏｔ］または［ｄｏｔ］ｊｐ［ｆｏｒｗａｒｄｓｌａｓｈ］ｃｏｄｏｎで入手可能な「Ｃｏｄｏｎ　Ｕｓａｇｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ」で容易に入手可能である。場合によっては、本開示の核酸は、真核細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、動物細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、真菌細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、植物細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、単子葉植物種における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、双子葉植物種における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、裸子植物種における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、被子植物種における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合に

よっては、本開示の核酸は、トウモロコシ細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、大豆細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、米細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、小麦細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、綿細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、モロコシ細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、アルファルファ細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、サトウキビ細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、トマト細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、キュウリ細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、ジャガイモ細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本開示の核酸は、藻類細胞における発現のためにコドン最適化されるＣａｓ１２Ｌポリペプチドコードヌクレオチド配列を含む。

【０２２０】

本開示は、（ｉ）ドナー鋳型核酸のヌクレオチド配列（ここで、ドナー鋳型は、標的核酸（例えば、標的ゲノム）の標的配列と相同性を有するヌクレオチド配列を含む）と、（ｉｉ）標的とされたゲノムの標的座位の標的配列にハイブリダイズするＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列（例えば、真核細胞等の標的細胞において作動可能なプロモーターに作動可能に連結されている）と、（ｉｉｉ）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質をコードするヌクレオチド配列（例えば、真核細胞等の標的細胞において作動可能なプロモーターに作動可能に連結されている）とを（場合によっては異なる組み換え発現ベクターに、及び場合によっては同じ組み換え発現ベクターに）含む、１つ以上の組み換え発現ベクターを提供する。本開示は、（ｉ）ドナー鋳型核酸のヌクレオチド配列（ここで、ドナー鋳型は、標的核酸（例えば、標的ゲノム）の標的配列と相同性を有するヌクレオチド配列を含む）と、（ｉｉ）標的とされたゲノムの標的座位の標的配列にハイブリダイズするＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列（例えば、真核細胞等の標的細胞において作動可能なプロモーターに作動可能に連結されている）とを（場合によっては異なる組み換え発現ベクターに、及び場合によっては同じ組み換え発現ベクターに）含む、１つ以上の組み換え発現ベクターを提供する。本開示は、（ｉ）標的とされたゲノムの標的座位の標的配列にハイブリダイズするＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列（例えば、真核細胞等の標的細胞において作動可能なプロモーターに作動可能に連結されている）と、（ｉｉ）Ｃａｓ１２Ｌタンパク質をコードするヌクレオチド配列（例えば、真核細胞等の標的細胞において作動可能なプロモーターに作動可能に連結されている）とを（場合によっては異なる組み換え発現ベクターに、及び場合によっては同じ組み換え発現ベクターに）含む、１つ以上の組み換え発現ベクターを提供する。

【０２２１】

好適な発現ベクターとしては、ウイルス発現ベクター（例えば、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス（例えば、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｖｅｓｔ　Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ　Ｓｃｉ　３５：２５４３　２５４９，１９９４、Ｂｏｒｒａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　６：５１５　５２４，１９９９、Ｌｉ　ａｎｄ　Ｄ

ａｖｉｄｓｏｎ，ＰＮＡＳ　９２：７７００　７７０４，１９９５、Ｓａｋａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　５：１０８８　１０９７，１９９９、ＷＯ９４／１２６４９、ＷＯ９３／０３７６９、ＷＯ９３／１９１９１、ＷＯ９４／２８９３８、ＷＯ９５／１１９８４、及びＷＯ９５／００６５５を参照されたい）、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）（例えば、Ａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　９：８１８６，１９９８、Ｆｌａｎｎｅｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　９４：６９１６　６９２１，１９９７、Ｂｅｎｎｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｖｅｓｔ　Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ　Ｓｃｉ　３８：２８５７　２８６３，１９９７、Ｊｏｍａｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　４：６８３　６９０，１９９７、Ｒｏｌｌｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　１０：６４１　６４８，１９９９、Ａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｍｏｌ　Ｇｅｎｅｔ　５：５９１　５９４，１９９６、ＷＯ９３／０９２３９におけるＳｒｉｖａｓｔａｖａ、Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒ．（１９８９）６３：３８２２－３８２８、Ｍｅｎｄｅｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．（１９８８）１６６：１５４－１６５、及びＦｌｏｔｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ（１９９３）９０：１０６１３－１０６１７を参照されたい）、ＳＶ４０、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（例えば、Ｍｉｙｏｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　９４：１０３１９　２３，１９９７、Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ　７３：７８１２　７８１６，１９９９を参照されたい）、レトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、ならびにレトロウイルス、例えば、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、及び乳房腫瘍ウイルスに由来するベクター）等に基づくウイルスベクターが挙げられる。場合によっては、本開示の組み換え発現ベクターは、組み換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである。場合によっては、本開示の組み換え発現ベクターは、組み換えレンチウイルスベクターである。場合によっては、本開示の組み換え発現ベクターは、組み換えレトロウイルスベクターである。

【０２２２】

植物用途に関しては、トバモウイルス、ポテックスウイルス、ポティウイルス、トブラウイルス、トンブスウイルス、ジェミニウイルス、ブロモウイルス、カーモウイルス、アルファモウイルス、またはククモウイルスに基づくウイルスベクターを使用することができる。例えば、Ｐｅｙｒｅｔ　ａｎｄ　Ｌｏｍｏｎｏｓｓｏｆｆ（２０１５）Ｐｌａｎｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｊ．１３：１１２１を参照されたい。好適なトバモウイルスベクターとしては、例えば、トマトモザイクウイルス（ＴｏＭＶ）ベクター、タバコモザイクウイルス（ＴＭＶ）ベクター、タバコマイルドグリーンモザイクウイルス（ＴＭＧＭＶ）ベクター、トウガラシ微斑ウイルス（ＰＭＭｏＶ）ベクター、パプリカ微斑ウイルス（ＰａＭＭＶ）ベクター、キュウリ（ｃｕｃｕｍｂｅｒ）緑斑モザイクウイルス（ＣＧＭＭＶ）ベクター、キュウリ（ｋｙｕｒｉ）緑斑モザイクウイルス（ＫＧＭＭＶ）ベクター、ハイビスカス潜在フォートピアスウイルス（ＨＬＦＰＶ）ベクター、オドントグロッサム輪点ウイルス（ＯＲＳＶ）ベクター、ジオウモザイクウイルス（ＲｅＭＶ）ベクター、ウチワサボテンサモンズウイルス（ＳＯＶ）ベクター、ワサビ斑紋ウイルス（ＷＭｏＶ）ベクター、アブラナモザイクウイルス（ＹｏＭＶ）ベクター、サンヘンプモザイクウイルス（ＳＨＭＶ）ベクター等が挙げられる。好適なポテックスウイルスベクターとしては、例えば、ジャガイモウイルスＸ（ＰＶＸ）ベクター、ジャガイモ黄斑モザイクウイルス（ＰＡＭＶ）ベクター、アルストロメリア（Ａｌｓｔｒｏｅｍｅｒｉａ）ウイルスＸ（ＡｌｓＶＸ）ベクター、サボテンウイルスＸ（ＣＶＸ）ベクター、シンビジウム（Ｃｙｍｂｉｄｉｕｍ）モザイクウイルス（ＣｙｍＭＶ）ベクター、ギボウシウイルスＸ（ＨＶＸ）ベクター、ユリウイルスＸ（ＬＶＸ）ベクター、スイセン（Ｎａｒｃｉｓｓｕｓ）モザイクウイルス（ＮＭＶ）ベクター、ネリネ（Ｎｅｒｉｎｅ）ウイルスＸ（ＮＶＸ）ベクター、オオバコ（Ｐｌａｎｔａｇｏ　ａｓｉａｔｉｃａ）モザイクウイルス（ＰｌＡＭＶ）ベクター、イチゴマイルドイエローエッジウイルス（ＳＭＹＥＶ）ベクター、チューリップウイルスＸ（ＴＶＸ）ベクター、シロクローバーモザイクウイルス（ＷＣｌＭＶ）ベクター、タ

ケモザイクウイルス（ＢａＭＶ）ベクター等が挙げられる。好適なポティウイルスベクターとしては、例えば、ジャガイモウイルスＹ（ＰＶＹ）ベクター、インゲンマメモザイクウイルス（ＢＣＭＶ）ベクター、クローバー葉脈黄化ウイルス（ＣｌＹＶＶ）ベクター、トケイソウ東アジアウイルス（ＥＡＰＶ）ベクター、フリージアモザイクウイルス（ＦｒｅＭＶ）ベクター、ヤマノイモモザイクウイルス（ＪＹＭＶ）ベクター、レタスモザイクウイルス（ＬＭＶ）ベクター、トウモロコシ萎縮モザイクウイルス（ＭＤＭＶ）ベクター、タマネギ萎縮ウイルス（ＯＹＤＶ）ベクター、パパイア輪点ウイルス（ＰＲＳＶ）ベクター、トウガラシ斑紋ウイルス（ＰｅｐＭｏＶ）ベクター、シソ（Ｐｅｒｉｌｌａ）斑紋ウイルス（ＰｅｒＭｏＶ）ベクター、ウメ輪紋ウイルス（ＰＰＶ）ベクター、ジャガイモウイルスＡ（ＰＶＡ）ベクター、モロコシモザイクウイルス（ＳｒＭＶ）ベクター、大豆モザイクウイルス（ＳＭＶ）ベクター、サトウキビモザイクウイルス（ＳＣＭＶ）ベクター、チューリップモザイクウイルス（ＴｕｌＭＶ）ベクター、カブモザイクウイルス（ＴｕＭＶ）ベクター、スイカモザイクウイルス（ＷＭＶ）ベクター、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス（ＺＹＭＶ）ベクター、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）ベクター等が挙げられる。好適なトブラウイルスベクターとしては、例えば、タバコ茎えそウイルス（ＴＲＶ）ベクター等が挙げられる。好適なトンブスウイルスベクターとしては、例えば、トマトブッシースタントウイルス（ＴＢＳＶ）ベクター、ナス斑紋クリンクルウイルス（ＥＭＣＶ）ベクター、ブドウアルジェリア潜在ウイルス（ＧＡＬＶ）ベクター等が挙げられる。好適なククモウイルスベクターとしては、例えば、キュウリモザイクウイルス（ＣＭＶ）ベクター、ラッカセイ矮化ウイルス（ＰＳＶ）ベクター、トマトアスペルミーウイルス（ＴＡＶ）ベクター等が挙げられる。好適なブロモウイルスベクターとしては、例えば、ブロムモザイクウイルス（ＢＭＶ）ベクター、ササゲクロロティックモットルウイルス（ＣＣＭＶ）ベクター等が挙げられる。好適なカーモウイルスベクターとしては、例えば、カーネーション斑紋ウイルス（ＣａｒＭＶ）ベクター、メロンえそ斑点ウイルス（ＭＮＳＶ）ベクター、エンドウ茎えそウイルス（ＰＳＮＶ）ベクター、カブリンクルウイルス（ＴＣＶ）ベクター等が挙げられる。好適なアルファモウイルスベクターとしては、例えば、アルファルファモザイクウイルス（ＡＭＶ）ベクター等が挙げられる。

【０２２３】

利用される宿主／ベクター系に応じて、構成的及び誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター等を含む、いくつかの好適な転写及び翻訳制御エレメントのうちのいずれかが、発現ベクター内で使用され得る。

【０２２４】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、制御エレメント、例えば、プロモーター等の転写制御エレメントに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質またはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、制御エレメント、例えば、プロモーター等の転写抑制エレメントに作動可能に連結されている。

【０２２５】

転写制御エレメントは、プロモーターであり得る。場合によっては、プロモーターは、構成的に活性なプロモーターである。場合によっては、プロモーターは、調節可能なプロモーターである。場合によっては、プロモーターは、誘導性プロモーターである。場合によっては、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。場合によっては、プロモーターは、細胞型特異的プロモーターである。場合によっては、転写制御エレメント（例えば、プロモーター）は、標的とされた細胞型または標的とされた細胞集団において機能的である。例えば、場合によっては、転写制御エレメントは、真核細胞、例えば、造血幹細胞（例えば、動員された末梢血（ｍＰＢ）ＣＤ３４（＋）細胞、骨髄（ＢＭ）ＣＤ３４（＋）細胞等）において機能的であり得る。

【０２２６】

真核細胞プロモーター（真核細胞中で機能的なプロモーター）の非限定的な例としては、ＥＦ１α、最初期のサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）由来のもの、単純ヘルペスウイル

ス（ＨＳＶ）チミジンキナーゼ、初期及び後期ＳＶ４０、レトロウイルス由来の長い末端反復（ＬＴＲ）、ならびにマウスメタロチオネイン－Ｉが挙げられる。適切なベクター及びプロモーターの選択は、当該技術分野における通常の技術の水準内に十分にある。発現ベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位及び転写ターミネーターを含有してもよい。発現ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含んでもよい。発現ベクターはまた、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質と融合されて、このようにして融合Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをもたらすことができる、タンパク質タグ（例えば、６×Ｈｉｓタグ、ヘマグルチニンタグ、蛍光タンパク質等）をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及び／またはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、誘導性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及び／またはＣａｓ１２Ｌ融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、構成的プロモーターに作動可能に連結されている。

【０２２８】

プロモーターは、構成的に活性なプロモーター（すなわち、構成的に活性／「ＯＮ」状態であるプロモーター）であり得、誘導性プロモーターであってもよく（すなわち、その活性／「ＯＮ」または不活性／「ＯＦＦ」状態が外部刺激、例えば、特定の温度、化合物、またはタンパク質の存在によって制御されるプロモーター）、空間的に制約されたプロモーター（すなわち、転写制御エレメント、エンハンサー等）（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）であってもよく、時間的に制約されたプロモーター（すなわち、プロモーターは、胚発達の特定段階中、または生物学的プロセスの特定段階、例えば、マウスにおける毛包サイクル中に、「ＯＮ」状態または「ＯＦＦ」状態である）であってもよい。

【０２２９】

好適なプロモーターは、ウイルスに由来し得、したがってウイルスプロモーターと称され得るか、またはそれらは原核生物もしくは真核生物を含む任意の生物に由来し得る。好適なプロモーターを使用して、任意のＲＮＡポリメラーゼ（例えば、ｐｏｌ　Ｉ、ｐｏｌ　ＩＩ、ｐｏｌ　ＩＩＩ）によって発現を駆動することができる。例示的なプロモーターとしては、ＳＶ４０初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスの長い末端配列（ＬＴＲ）プロモーター；アデノウイルス主要後期プロモーター（Ａｄ　ＭＬＰ）；単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、例えば、ＣＭＶ最初期プロモーター領域（ＣＭＶＩＥ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター、ヒトＵ６小核プロモーター（Ｕ６）（Ｍｉｙａｇｉｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０，４９７－５００（２００２））、強化Ｕ６プロモーター（例えば、Ｘｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００３　Ｓｅｐ　１；３１（１７））、ヒトＨ１プロモーター（Ｈ１）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２３０】

場合によっては、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、真核細胞において作動可能なプロモーター（例えば、Ｕ６プロモーター、強化Ｕ６プロモーター、Ｈ１プロモーター等）に作動可能に連結されている（その制御下にある）。当業者には理解されようが、（例えば、真核細胞中の）Ｕ６プロモーター、または別のＰｏｌＩＩＩプロモーターを使用して核酸（例えば、発現ベクター）からＲＮＡ（例えば、ガイドＲＮＡ）を発現させるとき、いくつかのＴが連続している（ＲＮＡにおいてＵをコードする）場合には、ＲＮＡを変異させる必要があり得る。これは、ＤＮＡにおける一連のＴ（例えば、５つのＴ）が、ポリメラーゼＩＩＩ（ＰｏｌＩＩＩ）のターミネーターとして作用し得るためである。したがって、真核細胞におけるガイドＲＮＡの転写を確実にするために、Ｔの連続性を排除するために、時としてガイドＲＮＡをコードする配列を改変することが必要であり得る。場合によっては、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質（例えば、野生型Ｃａｓ１

２Ｌタンパク質、ニッカーゼＣａｓ１２Ｌタンパク質、ｄＣａｓ１２Ｌタンパク質、融合Ｃａｓ１２Ｌタンパク質等）をコードするヌクレオチド配列は、真核細胞において作動可能なプロモーター（例えば、ＣＭＶプロモーター、ＥＦ１αプロモーター、エストロゲン受容体調節型プロモーター等）に作動可能に連結されている。

【０２３１】

誘導性プロモーターの例としては、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、Ｔ３　ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、イソプロピル－ベーター－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）調節型プロモーター、ラクトース誘導性プロモーター、ヒートショックプロモーター、テトラサイクリン調節型プロモーター、ステロイド調節型プロモーター、金属調節型プロモーター、エストロゲン受容体調節型プロモーター等が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、誘導性プロモーターは、ドキシサイクリン、エストロゲン、及び／またはエストロゲン類似体、ＩＰＴＧ等を含むがこれらに限定されない分子によって、調節することができる。

【０２３２】

使用に好適な誘導性プロモーターとしては、本明細書に記載されるか、または当業者に既知である、任意の誘導性プロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターの例としては、限定されないが、アルコール調節型プロモーター、テトラサイクリン調節型プロモーター（例えば、アンヒドロテトラサイクリン（ａＴｃ）応答性プロモーター、ならびにテトラサイクリンリプレッサータンパク質（ｔｅｔＲ）、テトラサイクリンオペレーター配列（ｔｅｔＯ）、及びテトラサイクリントランスアクティベーター融合タンパク質（ｔＴＡ）を含む、他のテトラサイクリン応答性プロモーター系）、ステロイド調節型プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体、ヒトエストロゲン受容体、ガエクジソン受容体に基づくプロモーター、及びステロイド／レチノイド／甲状腺受容体スーパーファミリー由来のプロモーター）、金属調節型プロモーター（例えば、酵母、マウス、及びヒト由来のメタロチオネイン（金属イオンに結合し、封鎖するタンパク質）に由来するプロモーター）、病因調節型プロモーター（例えば、サリチル酸、エチレン、またはベンゾチアジアゾール（ＢＴＨ）によって誘導される）、温度／熱誘導性プロモーター（例えば、ヒートショックプロモーター）、及び光調節型プロモーター（例えば、植物細胞由来の光応答性プロモーター）等の化学的／生化学的調節型及び物理的調節型プロモーターが挙げられる。

【０２３３】

場合によっては、プロモーターは、空間的に制約されたプロモーター（すなわち、細胞型特異的プロモーター、組織特異的プロモーター等）であり、それにより多細胞生物において、プロモーターは、特定細胞のサブセットにおいて活性（すなわち、「ＯＮ」）である。空間的に制約されたプロモーターはまた、エンハンサー、転写制御エレメント、制御配列等とも称され得る。プロモーターが標的宿主細胞（例えば、真核細胞、原核細胞）において機能的である限り、任意の簡便な空間的に制約されたプロモーターが使用され得る。

【０２３４】

場合によっては、プロモーターは、可逆的プロモーターである。可逆的誘導性プロモーターを含む好適な可逆的プロモーターは、当該技術分野で既知である。そのような可逆的プロモーターは、多くの生物、例えば、真核生物及び原核生物から単離され得、それに由来し得る。第２の生物において使用するための第１の生物（例えば、第１の原核生物及び第２の真核生物、第１の真核生物及び第２の原核生物等）に由来する可逆的プロモーターの改変は、当該技術分野で周知である。そのような可逆的プロモーター、及び、そのような可逆的プロモーターに基づくだけでなく追加の制御タンパク質も含む系としては、アルコール調節型プロモーター（例えば、アルコールデヒドロゲナーゼＩ（ａｌｃＡ）遺伝子プロモーター、アルコールトランスアクティベータータンパク質（ＡｌｃＲ）に応答性のプロモーター等）、テトラサイクリン調節型プロモーター（例えば、ＴｅｔＡｃｔｉｖａｔｏｒ、ＴｅｔＯＮ、ＴｅｔＯＦＦ等を含むプロモーター系）、ステロイド調節型プロモ

ーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体プロモーター系、ヒトエストロゲン受容体プロモーター系、レチノイドプロモーター系、甲状腺プロモーター系、エクジソンプロモーター系、ミフェプリストンプロモーター系等）、金属調節型プロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター系等）、病原体関連調節型プロモーター（例えば、サリチル酸調節型プロモーター、エチレン調節型プロモーター、ベンゾチアジアゾール調節型プロモーター等）、温度調節型プロモーター（例えば、ヒートショック誘導性プロモーター（例えば、ＨＳＰ－７０、ＨＳＰ－９０、ダイズヒートショックプロモーター等）、光調節型プロモーター、合成誘導性プロモーター等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２３５】

ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩＩ）プロモーターを使用して、非タンパク質コードＲＮＡ分子（例えば、ガイドＲＮＡ）の発現を駆動することができる。場合によっては、好適なプロモーターは、Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターである。場合によっては、Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターは、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。場合によっては、Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターは、単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。場合によっては、Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターは、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。場合によっては、Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターは、ｔｒａｃｒＲＮＡをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。

【０２３６】

Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの非限定的な例としては、Ｕ６プロモーター、Ｈｌプロモーター、５Ｓプロモーター、アデノウイルス２（Ａｄ２）ＶＡＩプロモーター、ｔＲＮＡプロモーター、及び７ＳＫプロモーターが挙げられる。例えば、Ｓｃｈｒａｍｍ　ａｎｄ　Ｈｅｒｎａｎｄｅｚ（２００２）Ｇｅｎｅｓ　＆　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１６：２５９３－２６２０を参照されたい。場合によっては、Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターは、Ｕ６プロモーター、Ｈｌプロモーター、５Ｓプロモーター、アデノウイルス２（Ａｄ２）ＶＡＩプロモーター、ｔＲＮＡプロモーター、及び７ＳＫプロモーターからなる群から選択される。場合によっては、ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、Ｕ６プロモーター、Ｈｌプロモーター、５Ｓプロモーター、アデノウイルス２（Ａｄ２）ＶＡＩプロモーター、ｔＲＮＡプロモーター、及び７ＳＫプロモーターからなる群から選択されるプロモーターに作動可能に連結されている。場合によっては、単一ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、Ｕ６プロモーター、Ｈｌプロモーター、５Ｓプロモーター、アデノウイルス２（Ａｄ２）ＶＡＩプロモーター、ｔＲＮＡプロモーター、及び７ＳＫプロモーターからなる群から選択されるプロモーターに作動可能に連結されている。

【０２３７】

植物、植物組織、及び植物細胞における発現に関連して本明細書で使用され得るプロモーターを説明する例としては、米国特許第６，４３７，２１７号（トウモロコシＲＳ８１プロモーター）、米国特許第５，６４１，８７６号（米アクチンプロモーター）、米国特許第６，４２６，４４６号（トウモロコシＲＳ３２４プロモーター）、米国特許第６，４２９，３６２号（トウモロコシＰＲ－ｌプロモーター）、米国特許第６，２３２，５２６号（トウモロコシＡ３プロモーター）、米国特許第６，１７７，６１１号（構成的トウモロコシプロモーター）、米国特許第５，３２２，９３８号、同第５，３５２，６０５号、同第５，３５９，１４２号、及び同第５，５３０，１９６号（３５Ｓプロモーター）、米国特許第６，４３３，２５２号（トウモロコシＬ３オレオシンプロモーター）、米国特許第６，４２９，３５７号（米アクチン２プロモーターならびに米アクチン２イントロン）、米国特許第５，８３７，８４８号（根特異的プロモーター）、米国特許第６，２９４，７１４号（光誘導性プロモーター）、米国特許第６，１４０，０７８号（塩誘導性プロモーター）、米国特許第６，２５２，１３８号（病原体誘導性プロモーター）、米国特許第６，１７５，０６０号（リン欠損誘導性プロモーター）、米国特許第６，６３５，８０６

号（ガンマ－コイキシン（ｃｏｉｘｉｎ）プロモーター）、及び米国特許出願第０９／７５７，０８９号（トウモロコシ葉緑体アルドラーゼプロモーター）に記載されるプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。利用することができるさらなるプロモーターとしては、ノーパリンシンターゼ（ＮＯＳ）プロモーター（Ｅｂｅｒｔら、１９８７）、オクトピンシンターゼ（ＯＣＳ）プロモーター（これはアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）の腫瘍誘導プラスミド上に担持される）、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）１９Ｓプロモーター等のカリモウイルスプロモーター（Ｌａｗｔｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８７）９：３１５－３２４）、ＣａＭＶ ３５Ｓプロモーター（Ｏｄｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８５）３１３：８１０－８１２）、ゴマノハグサモザイクウイルス３５Ｓ－プロモーター（米国特許第６，０５１，７５３号、同第５，３７８，６１９号）、スクロースシンターゼプロモーター（Ｙａｎｇ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳＡ（１９９０）８７：４１４４ －４１４８）、Ｒ遺伝子複合体プロモーター（Ｃｈａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．、Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ（１９８９）１：１１７５ －１１８３）、及び葉緑素ａ／ｂ結合タンパク質遺伝子プロモーター、ＰＣ１ＳＶ（米国特許第５，８５０，０１９号）、及びＡＧＲｔｕ．ｎｏｓ（ＧｅｎＢａｎｋ受託Ｖ００８７、Ｄｅｐｉｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９８２）１：５６１－５７３、Ｂｅｖａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３）プロモーターが挙げられる。

【０２３８】

核酸（例えば、ドナーポリヌクレオチド配列を含む核酸、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質及び／またはＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸等）を宿主細胞に導入する方法は、当該技術分野で既知であり、任意の簡便な方法を使用して、核酸（例えば、発現構築物）を細胞に導入することができる。好適な方法としては、例えば、ウイルス感染、形質移入、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）媒介型形質移入、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介型形質移入、リポソーム媒介型形質移入、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈降、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介型核酸送達等が挙げられる。

【０２３９】

組み換え発現ベクターを細胞に導入することは、任意の培養培地中で、及び細胞の生存を促進する任意の培養条件下で起こり得る。組み換え発現ベクターを標的細胞に導入することは、インビボまたはエクスビボで実行され得る。組み換え発現ベクターを標的細胞に導入することは、インビトロで実行され得る。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、ＲＮＡとして提供され得る。ＲＮＡは、直接化学合成によって提供され得るか、または（例えば、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質をコードする）ＤＮＡからインビトロで転写され得る。一度合成されると、ＲＮＡは、核酸を細胞に導入するための周知の技法（例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、形質移入等）のうちのいずれかによって細胞に導入され得る。

【０２４１】

核酸は、十分に開発された形質移入技法（例えば、Ａｎｇｅｌ及びＹａｎｉｋ（２０１０）ＰＬｏＳ ＯＮＥ ５（７）：ｅ１１７５６を参照されたい）、ならびにＱｉａｇｅｎから市販されているＴｒａｎｓＭｅｓｓｅｎｇｅｒ（登録商標）試薬、ＳｔｅｍｇｅｎｔからのＳｔｅｍｆｅｃｔ（商標）ＲＮＡ形質移入キット、及びＭｉｒｕｓ Ｂｉｏ ＬＬＣからのＴｒａｎｓＩＴ（登録商標）－ｍＲＮＡ形質移入キットを使用して、細胞に提供され得る。また、Ｂｅｕｍｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００８）ＰＮＡＳ １０５（５０）：１９８２１－１９８２６も参照されたい。

【０２４２】

ベクターは、標的宿主細胞に直接提供され得る。換言すれば、細胞を、対象の核酸を含むベクター（例えば、ドナー鋳型配列を有し、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする組み換え発現ベクター、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質をコードする組み換え発現ベクター等）と接触させ、それによりベクターが細胞によって取り込まれる。細胞を、プラスミドである核酸ベクターと接触させるための方法としては、エレクトロポレーション、塩化カルシウム形質移入、マイクロインジェクション、及びリポフェクションが挙げられ、当該技術分野で周知である。ウイルスベクター送達の場合、細胞は、対象のウイルス発現ベクターを含むウイルス粒子と接触させることができる。

【０２４３】

レトロウイルス、例えば、レンチウイルスは、本開示の方法における使用に好適である。一般的に使用されるレトロウイルスベクターは「欠陥がある」、すなわち、増殖性感染に必要なウイルスタンパク質を生成することができない。むしろ、ベクターの複製は、パッケージング細胞株における増殖を必要とする。関心対象の核酸を含むウイルス粒子を作製するために、その核酸を含むレトロウイルス核酸が、パッケージング細胞株によってウイルスカプシドにパッケージされる。異なるパッケージング細胞株は、異なるエンベロープタンパク質（エコトロピック、アンホトロピック、またはゼノトロピック）がカプシドに組み込まれることを可能にし、このエンベロープタンパク質が、細胞に対するウイルス粒子の特異性を決定する（マウス及びラットに対してはエコトロピック、ヒト、イヌ、及びマウスを含む大部分の哺乳類細胞型に対してはアンホトロピック、ならびにマウス細胞を除く大部分の哺乳類細胞型に対してはゼノトロピック）。適切なパッケージング細胞株を使用して、パッケージされたウイルス粒子によって細胞が標的とされることを確実にしてもよい。対象のベクター発現ベクターをパッケージング細胞株に導入する方法及びパッケージング株によって作製されるウイルス粒子を収集する方法は、当該技術分野で周知である。核酸はまた、直接マイクロインジェクション（例えば、ＲＮＡのインジェクション）によって導入することもできる。

【０２４４】

Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及び／またはＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする核酸を標的宿主細胞に提供するために使用されるベクターは、関心対象の核酸の発現、つまり転写活性化を駆動するための好適なプロモーターを含み得る。換言すれば、場合によっては、関心対象の核酸は、プロモーターに作動可能に連結される。これは、遍在的に作用するプロモーター、例えば、ＣＭＶ－β－アクチンプロモーター、または誘導性プロモーター、例えば、特定の細胞集団において活性であるか、もしくはテトラサイクリン等の薬物の存在に応答するプロモーターを含み得る。転写活性化とは、転写が、標的細胞中の基底レベルよりも１０倍、１００倍、より通常は１０００倍増加することを意図する。加えて、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及び／またはＣａｓ１２Ｌタンパク質をコードする核酸を細胞に提供するために使用されるベクターは、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及び／またはＣａｓ１２Ｌタンパク質を取り込んだ細胞を特定するように、標的細胞において選択可能なマーカーをコードする核酸配列を含み得る。

【０２４５】

Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、またはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、場合によってはＲＮＡである。したがって、Ｃａｓ１２Ｌ融合タンパク質は、ＲＮＡとして細胞に導入することができる。ＲＮＡを細胞に導入する方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、直接注入、形質移入、またはＤＮＡの導入のために使用される任意の他の方法を含み得る。Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、代わりにポリペプチドとして細胞に提供されてもよい。そのようなポリペプチドは、任意選択で生成物の溶解度を増加させるポリペプチドドメインに融合させてもよい。このドメインは、定義されたプロテアーゼ切断部位、例えば、ＴＥＶプロテアーゼによって切断される、ＴＥＶ配列を通して、ポリペプチドと連結され得る。リンカーはまた、１つ以上の柔軟な配列、例えば、１～１０個のグリシン残基も含み得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質の切断は、生成物の溶解性を維持する緩衝液中、例えば、０．５～２Ｍの尿素の存在下、

溶解性を増加させるポリペプチド及び／またはポリヌクレオチドの存在下等で行われる。関心対象のドメインには、エンドソーム不安定化ドメイン、例えば、インフルエンザＨＡドメイン、及び生成を補助する他のポリペプチド、例えば、ＩＦ２ドメイン、ＧＳＴドメイン、ＧＲＰＥドメイン等が含まれる。ポリペプチドは、安定性の改善のために調合され得る。例えば、ペプチドは、ＰＥＧ化されてもよく、ポリエチレンオキシ基が、血流中の寿命の向上を提供する。

【０２４６】

加えて、または代替として、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、ポリペプチド浸透性ドメインと融合されて、細胞による取り込みを促進することができる。いくつかの浸透性ドメインが当該技術分野で既知であり、ペプチド、ペプチド模倣体、及び非ペプチド担体を含む、本開示の非組み込みポリペプチドにおいて使用され得る。例えば、浸透性ペプチドは、アミノ酸配列ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（配列番号４４）を含む、ペネトラチンと称される、キイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）転写因子アンテナペディアの第３のアルファヘリックスに由来し得る。別の例としては、浸透性ペプチドは、ＨＩＶ－１ ｔａｔ塩基性領域アミノ酸配列を含み、これは、例えば、天然型ｔａｔタンパク質のアミノ酸４９～５７を含み得る。他の浸透性ドメインには、ポリ－アルギニンモチーフ、例えば、ＨＩＶ－１ ｒｅｖタンパク質のアミノ酸３４～５６の領域、ノナ－アルギニン、オクタ－アルギニン等を含む（例えば、転位ペプチド及びペプトイドの教示について参照により本明細書に具体的に組み込まれる、Ｆｕｔａｋｉ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｃｕｒｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｅｐｔ Ｓｃｉ．２００３ Ａｐｒ；４（２）：８７－９ ａｎｄ ４４６、及びＷｅｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ ２０００ Ｎｏｖ．２１；９７（２４）：１３００３－８、公開された米国特許出願２００３０２２０３３４、２００３００８３２５６、２００３００３２５９３、及び２００３００２２８３１を参照されたい）。ノナ－アルギニン（Ｒ９）配列は、特性評価されたより効率的なＰＴＤのうちの１つである（Ｗｅｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．２０００、Ｕｅｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．２００２）。融合が行われる部位は、ポリペプチドの生物活性、分泌、または結合特徴を最適化するために選択され得る。最適な部位は、慣例の実験によって決定される。

【０２４７】

上述のように、場合によっては、標的細胞は、植物細胞である。植物細胞における染色体またはプラスチドを組み換え核酸で形質転換するための多数の方法が、当該技術分野で既知であり、これらは、トランスジェニック植物細胞及び／またはトランスジェニック植物を生み出すために、本出願の方法に従って使用され得る。当該技術分野で既知の植物細胞の形質転換のための任意の好適な方法または技法を使用することができる。植物の形質転換のための有効な方法としては、アグロバクテリウム媒介型またはリゾビウム（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）媒介型形質転換等の細菌媒介型形質転換、及びマイクロプロジェクタイルボンバードメント媒介型形質転換が挙げられる。細菌媒介型形質転換またはマイクロプロジェクタイルボンバードメントを介して形質転換ベクターで外植体を形質転換し、次いでその後、それらの外植体の培養等によりトランスジェニック植物を再生または開発するための様々な方法が当該技術分野で既知である。マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、真空浸潤、圧力、超音波処理、炭化ケイ素繊維撹拌、ＰＥＧ媒介型形質転換等の植物形質転換のための他の方法もまた、当該技術分野で既知である。これらの形質転換方法によって生成されたトランスジェニック植物は、使用される方法及び外植体に応じて形質転換事象に関してキメラまたは非キメラであり得る。

【０２４８】

植物細胞を形質転換する方法は、当業者に周知である。例えば、組み換えＤＮＡで被覆された粒子を用いたマイクロプロジェクタイルボンバードメントによる植物細胞の形質転換（例えば、微粒子銃形質転換）に関する具体的な手順説明は、米国特許第５，５５０，３１８号、同第５，５３８，８８０号、同第６，１６０，２０８号、同第６，３９９，８６１号、及び同第６，１５３，８１２号に見出され、アグロバクテリウム媒介型形質転換

は、米国特許第５，１５９，１３５号、同第５，８２４，８７７号、同第５，５９１，６１６号、同第６，３８４，３０１号、同第５，７５０，８７１号、同第５，４６３，１７４号、及び同第５，１８８，９５８号に記載されている。植物を形質転換するためのさらなる方法は、例えば、Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｃｒｏｐ Ｐｌａｎｔｓ（２００９）Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇに見出すことができる。本明細書に提供される核酸のうちのいずれかで植物細胞を形質転換するために、当業者に既知の任意の適切な方法を使用することができる。

【０２４９】

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、インビトロで、または真核細胞によって、または原核細胞によって生成されてもよく、それは、アンフォールディング、例えば、熱変性、ジチオスレイトール還元等によってさらに処理されてもよく、当該技術分野で既知の方法を使用して、さらにリフォールディングされてもよい。

【０２５０】

一次配列を変更しない関心対象の修飾には、ポリペプチドの化学誘導体化、例えば、アシル化、アセチル化、カルボキシル化、アミド化等が含まれる。また、グリコシル化の修飾、例えば、その合成及び処理中またはさらなる処理ステップ中にポリペプチドのグリコシル化パターンを修飾することによって、例えば、ポリペプチドを、哺乳類グリコシル化または脱グリコシル化酵素等のグリコシル化に影響を及ぼす酵素に曝露することによって行われるものも含まれる。また、リン酸化アミノ酸残基、例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、またはホスホスレオニンを有する配列も包含される。

【０２５１】

また、核酸（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする、Ｃａｓ１２Ｌ融合タンパク質をコードする等）、ならびにタンパク質分解に対するそれらの耐性を改善するか、標的配列特異性を変更するか、溶解特性を最適化するか、タンパク質活性（例えば、転写調節活性、酵素活性等）を変更するか、またはそれらをより好適にするように、通常の分子生物学的技法及び合成化学を使用して改変されたタンパク質（例えば、野生型タンパク質またはバリアントタンパク質に由来するＣａｓ１２Ｌ融合タンパク質）も、本開示の実施形態に含めるのに好適である。そのようなポリペプチドの類似体としては、天然型Ｌ－アミノ酸以外、例えば、Ｄ－アミノ酸または非天然型合成アミノ酸の残基を含有するものが挙げられる。Ｄ－アミノ酸で、いくつかまたは全てのアミノ酸残基を置換してもよい。

【０２５２】

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、当該技術分野で既知の従来方法を使用して、インビトロ合成によって調製されてもよい。様々な市販の合成装置、例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．、Ｂｅｃｋｍａｎ等による自動合成装置が入手可能である。合成装置を使用することによって、天然型アミノ酸を、非天然のアミノ酸で置換してもよい。特定の配列及び調製方法は、簡便性、経済性、必要とされる純度等によって決定される。

【０２５３】

所望であれば、合成中または発現中に、様々な基をペプチドに導入してもよく、これにより他の分子または表面への連結が可能となる。したがって、チオエーテルを作製するためにシステインを、金属イオン錯体に連結するためにヒスチジンを、アミドまたはエステルを形成するためにカルボキシル基を、アミドを形成するためにアミノ基を使用することができる等である。

【０２５４】

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドはまた、組み換え合成の従来方法に従って単離及び精製されてもよい。発現宿主から溶解物が調製され、溶解物は、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、親和性クロマトグラフィー、または他の精製技法を使用して精製されてもよい。大概、使用される組成物は、生成物の調製及びその精製の方法に関連する夾雑物に対して、所望の生成物を２０重量％以上、より通常は７５重量％以上、好ましくは９５重量％以上、治療目的の場合は通常９９．５

重量％以上含む。通常、パーセンテージは、総タンパク質に基づく。したがって、場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドまたは Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、少なくとも８０％純粋、少なくとも８５％純粋、少なくとも９０％純粋、少なくとも９５％純粋、少なくとも９８％純粋、または少なくとも９９％純粋である（例えば、夾雑物、非Ｃａｓ１２Ｌタンパク質、または他の高分子等を含まない）。

【０２５５】

切断もしくは任意の所望の修飾を標的核酸（例えば、ゲノムＤＮＡ）に誘導するため、または任意の所望の修飾を、標的核酸と会合したポリペプチドに誘導するために、本開示のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及び／またはＣａｓ１２Ｌポリペプチド及び／またはドナー鋳型配列は、それらが核酸としてまたはポリペプチドとして導入されるかにかかわらず、約３０分間～約２４時間、例えば、１時間、１．５時間、２時間、２．５時間、３時間、３．５時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、１２時間、１６時間、１８時間、２０時間、または約３０分間～約２４時間の任意の他の期間にわたって細胞に提供され、これはほぼ毎日～約４日毎の頻度、例えば、１．５日毎、２日毎、３日毎、またはほぼ毎日～約４日毎の任意の他の頻度で繰り返されてもよい。薬剤（複数可）は、対象の細胞に１回以上、例えば、１回、２回、３回、または４回以上提供されてもよく、細胞は、各接触事象に続くいくらかの時間、例えば、１６～２４時間にわたって、薬剤（複数可）と共にインキュベートされ、この時間の後に培地は新鮮な培地で置き換えられ、細胞はさらに培養される。

【０２５６】

２つ以上の異なる標的指向複合体（例えば、同じまたは異なる標的核酸内の異なる配列に対して相補的である２つの異なるＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ）が細胞に提供される場合には、複合体は、同時に提供され得るか（例えば、２つのポリペプチド及び／または核酸として）、または同時に送達され得る。代替として、それらは順次に提供されてもよく、例えば、標的指向複合体が最初に提供され、続いて第２の標的指向複合体が提供される等、またはその逆も同様である。

【０２５７】

標的細胞中へのＤＮＡベクターの送達を改善するために、ＤＮＡは、例えば、リポプレックス及びポリプレックスを使用することによって、損傷から保護され、細胞中へのその進入が容易にされ得る。したがって、場合によっては、本開示の核酸（例えば、本開示の組み換え発現ベクター）は、ミセルまたはリポソームのような組織化された構造において脂質で被覆され得る。組織化された構造がＤＮＡと複合体化される場合、それはリポプレックスと呼ばれる。アニオン性（負荷電）、中性、またはカチオン性（正荷電）の３種類の脂質が存在する。カチオン性脂質を利用するリポプレックスは、遺伝子移入に有用であることが判明している。カチオン性脂質は、それらの正電荷により、負荷電ＤＮＡと天然に複合体を形成する。また、それらの電荷の結果として、それらは細胞膜と相互作用する。次いで、リポプレックスのエンドサイトーシスが起こり、ＤＮＡが細胞質中に放出される。カチオン性脂質はまた、細胞によるＤＮＡの変性に対して保護する。

【０２５８】

ポリマーのＤＮＡとの複合体は、ポリプレックスと呼ばれる。ほとんどのポリプレックスは、カチオン性ポリマーからなり、それらの生成はイオン性相互作用によって調節される。ポリプレックス及びリポプレックスの作用方法の間の１つの大きな差異は、ポリプレックスが、それらのＤＮＡ負荷を細胞質中に放出できないことであり、このため、不活性化アデノウイルス等のエンドソーム溶解剤（エンドサイトーシス中に作製されるエンドソームを溶解する）との共形質移入が起こらなければならない。しかしながら、これは常にそうであるとは限らず、ポリエチレンイミン等のポリマーは、それら独自のエンドソーム破壊方法を有し、キトサン及びトリメチルキトサンも同様である。

【０２５９】

また、球形状を有する高度に分岐した高分子であるデンドリマーを使用して、幹細胞を遺伝子改変してもよい。デンドリマー粒子の表面を官能化して、その特性を変更してもよ

い。特に、カチオン性デンドリマー（すなわち、正の表面電荷を有するもの）を構築することが可能である。ＤＮＡプラスミド等の遺伝物質の存在下にあるとき、電荷相補性は、核酸とカチオン性デンドリマーとの一時的会合をもたらす。送達先に到達したとき、デンドリマー核酸複合体は、エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれ得る。

【０２６０】

場合によっては、本開示の核酸（例えば、発現ベクター）は、関心対象のガイド配列のための挿入部位を含む。例えば、核酸は、関心対象のガイド配列のための挿入部位を含み得、ここで、挿入部位は、ガイド配列が変化して所望の標的配列にハイブリダイズしても変化しないＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡの部分をコードするヌクレオチド配列（例えば、ガイドＲＮＡのＣａｓ１２Ｌ結合態様に寄与する配列、例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡのｄｓＲＮＡ二重鎖（複数可）に寄与する配列であり、ガイドＲＮＡのこの部分はまた、ガイドＲＮＡの「足場」または「定常領域」とも称され得る）の直ぐ隣にある。したがって、場合によっては、対象の核酸（例えば、発現ベクター）は、ガイドＲＮＡのガイド配列部分をコードする部分が挿入配列（挿入部位）であることを除いて、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む。挿入部位は、所望の配列の挿入のために使用される任意のヌクレオチド配列である。様々な技術と共に使用するための「挿入部位」は、当業者に既知であり、任意の簡便な挿入部位を使用することができる。挿入部位は、核酸配列を操作するための任意の方法のためのものであり得る。例えば、場合によっては、挿入部位は、複数クローニング部位（ＭＣＳ）（例えば、１つ以上の制限酵素認識配列を含む部位）、ライゲーション非依存性クローニングのための部位、組み換えに基づくクローニングのための部位（例えば、ａｔｔ部位に基づく組み換え）、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ（例えば、Ｃａｓ９）に基づく技術によって認識されるヌクレオチド配列等である。

【０２６１】

挿入部位は、任意の望ましい長さであることができ、挿入部位の種類に依存し得る（例えば、その部位が１つ以上の制限酵素認識配列を含むかどうか（またその数）、その部位がＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質に対する標的部位を含むかどうか等に依存し得る）。場合によっては、対象の核酸の挿入部位は、３以上のヌクレオチド（ｎｔ）長（例えば、５以上、８以上、１０以上、１５以上、１７以上、１８以上、１９以上、２０以上、もしくは２５以上、または３０以上のｎｔ長）である。場合によっては、対象の核酸の挿入部位の長さは、２～５０ヌクレオチド（ｎｔ）（例えば、２～４０ｎｔ、２～３０ｎｔ、２～２５ｎｔ、２～２０ｎｔ、５～５０ｎｔ、５～４０ｎｔ、５～３０ｎｔ、５～２５ｎｔ、５～２０ｎｔ、１０～５０ｎｔ、１０～４０ｎｔ、１０～３０ｎｔ、１０～２５ｎｔ、１０～２０ｎｔ、１７～５０ｎｔ、１７～４０ｎｔ、１７～３０ｎｔ、１７～２５ｎｔ）の範囲の長さを有する。場合によっては、対象の核酸の挿入部位の長さは、５～４０ｎｔの範囲の長さを有する。

【０２６２】

核酸修飾

いくつかの実施形態では、対象の核酸（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ）は、核酸に新たなまたは強化された特徴（例えば、改善された安定性）を提供するために、１つ以上の修飾、例えば、塩基修飾、骨格修飾等を有する。ヌクレオシドは、塩基－糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は、通常、複素環式塩基である。そのような複素環式塩基の２つの最も一般的なクラスは、プリン及びピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合、リン酸基は、糖の２’、３’、または５’ヒドロキシル部分に連結され得る。オリゴヌクレオチドの形成において、リン酸基は、隣接するヌクレオシドと互いに共有結合して、線状ポリマー化合物を形成する。次に、この線状ポリマー化合物のそれぞれの末端は、さらにつなげられて環状化合物を形成することができるが、線状化合物が好適である。加えて、線状化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有し得、したがって完全にまたは部分的に二本鎖の化合物を生み出すような様態で折り畳まれてもよい。オリゴヌクレオチド内では、リン酸基は、一般的に、オリゴヌクレオチド

のヌクレオシド間骨格を形成していると称される。ＲＮＡ及びＤＮＡの通常の連結または骨格は、３’から５’のホスホジエステル連結である。

【０２６３】

好適な核酸修飾としては、２’Ｏメチル修飾ヌクレオチド、２’フルオロ修飾ヌクレオチド、ロックド核酸（ＬＮＡ）修飾ヌクレオチド、ペプチド核酸（ＰＮＡ）修飾ヌクレオチド、ホスホロチオエート連結を有するヌクレオチド、及び５’キャップ（例えば、７－メチルグアニレートキャップ（ｍ７Ｇ））が挙げられるが、これらに限定されない。追加の詳細及び追加の修飾が以下に記載される。

【０２６４】

２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド（２’－Ｏ－メチルＲＮＡとも称される）は、転写後修飾として生じる、ｔＲＮＡ及び他の小分子ＲＮＡ中に見出されるＲＮＡの天然型修飾である。２’－Ｏ－メチルＲＮＡを含有するオリゴヌクレオチドは、直接合成することができる。この修飾は、ＲＮＡ：ＲＮＡ二重鎖のＴｍを増加させるが、ＲＮＡ：ＤＮＡ安定性においてはわずかな変化をもたらすにすぎない。これは一本鎖リボヌクレアーゼによる攻撃に対して安定しており、典型的にはＤＮＡよりもＤＮａｓｅの影響を５～１０倍受けにくい。これは、安定性及び標的メッセージに対する結合親和性を増加させる手段として、アンチセンスオリゴにおいて一般的に使用される。

【０２６５】

２’フルオロ修飾ヌクレオチド（例えば、２’フルオロ塩基）は、天然のＲＮＡと比較したときに、結合親和性（Ｔｍ）を増加させ、またいくらかの相対的ヌクレアーゼ耐性を付与する、フッ素修飾リボースを有する。これらの修飾は、血清または他の生体液中の安定性を改善するために、リボザイム及びｓｉＲＮＡにおいて一般的に用いられる。

【０２６６】

ＬＮＡ塩基は、塩基をＣ３’エンド型位置でロックする、リボース骨格に対する修飾を有し、これはＲＮＡ　Ａ型らせん二重鎖幾何形状に有利である。この修飾は、Ｔｍを著しく増加させ、また非常にヌクレアーゼ耐性がある。オリゴにおいて複数のＬＮＡ挿入を、３’末端を除く任意の位置に配置することができる。アンチセンスオリゴから、ＳＮＰ検出及びアレル特異的ＰＣＲに対するハイブリダイゼーションプローブに及ぶ用途が記載されている。ＬＮＡによって付与されるＴｍの大幅な増加に起因して、それらはまた、プライマー二量体形成ならびに自己ヘアピン形成の増加も引き起こすことができる。場合によっては、単一のオリゴに組み込まれるＬＮＡの数は、１０塩基以下である。

【０２６７】

ホスホロチオエート（ＰＳ）結合（すなわち、ホスホロチオエート連結）は、核酸（例えば、オリゴ）のリン酸骨格中の非架橋酸素を、硫黄原子で置き換える。この修飾は、ヌクレアーゼ変性に対する耐性をヌクレオチド間連結に付与する。ホスホロチオエート結合は、エキソヌクレアーゼ変性を阻害するために、オリゴの５’末端または３’末端において最後の３－５ヌクレオチド間に導入することができる。ホスホロチオエート結合をオリゴ内（例えば、オリゴ全体にわたって）に含めることは、エンドヌクレアーゼによる攻撃を低減する一助ともなり得る。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、対象の核酸は、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドである１つ以上のヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、対象の核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ、ｓｉＮＡ等）は、１つ以上の２’フルオロ修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、対象の核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ、ｓｉＮＡ等）は、１つ以上のＬＮＡ塩基を有する。いくつかの実施形態では、対象の核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ、ｓｉＮＡ等）は、ホスホロチオエート結合によって連結された１つ以上のヌクレオチドを有する（すなわち、対象の核酸は、１つ以上のホスホロチオエート連結を有する）。いくつかの実施形態では、対象の核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ、ｓｉＮＡ等）は、５’キャップ（例えば、７－メチルグアニレートキャップ（ｍ７Ｇ））を有する。いくつかの実施形態では、対象の核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ、ｓｉＮＡ等）は、修飾ヌクレオチドの組み合わせを有する。

例えば、対象の核酸（例えば、ｄｓＲＮＡ、ｓｉＮＡ等）は、他の修飾（例えば、２’－Ｏ－メチルヌクレオチド及び／または２’フルオロ修飾ヌクレオチド及び／またはＬＮＡ塩基及び／またはホスホロチオエート連結）を有する１つ以上のヌクレオチドを有することに加えて、５’キャップ（例えば、７－メチルグアニレートキャップ（ｍ７Ｇ））を有することができる。

【０２６９】

修飾骨格及び修飾ヌクレオシド間連結

修飾を含有する好適な核酸（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ）の例としては、修飾骨格または非天然のヌクレオシド間連結を含有する核酸が挙げられる。修飾骨格を有する核酸には、骨格内にリン原子を保持するもの、及び骨格内にリン原子を有しないものが含まれる。

【０２７０】

リン酸原子を中に含有する好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネート（３’－アルキレンホスホネート、５’－アルキレンホスホネート、及びキラルホスホネートを含む）、ホスフィネート、ホスホロアミダート（３’－アミノホスホロアミダート及びアミノアルキルホスホロアミダートを含む）、ホスホロジアミダート、チオノホスホロアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、及び通常３’－５’連結を有するボラノホスフェート、これらの２’－５’連結類似体、ならびに１つ以上のヌクレオチド間連結が３’－３’、５’－５’、または２’－２’連結である、反転極性を有するものが挙げられる。反転極性を有する好適なオリゴヌクレオチドは、３’最端ヌクレオチド間連結において単一の３’－３’連結を含む、すなわち、塩基性であり得る単一の反転ヌクレオシド残基を含む（核酸塩基が欠損しているか、またはその代わりにヒドロキシル基を有する）。様々な塩（例えば、カリウムまたはナトリウム等）、混合塩、及び遊離酸形態もまた含まれる。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、対象の核酸は、１つ以上のホスホロチオエート及び／またはヘテロ原子ヌクレオシド間連結、特に－ＣＨ$_2$－ＮＨ－Ｏ－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｏ－ＣＨ$_2$－（メチレン（メチルイミノ）またはＭＭＩ骨格として知られる）、－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｎ（ＣＨ$_3$）－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｎ（ＣＨ$_3$）－ＣＨ$_2$－及び－Ｏ－Ｎ（ＣＨ$_3$）－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－（天然のホスホジエステルヌクレオチド間連結は、－Ｏ－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－として表される）を含む。ＭＭＩ型ヌクレオシド間連結は、上記で参照された米国特許第５，４８９，６７７号で開示されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。好適なアミドヌクレオシド間連結は、米国特許第５，６０２，２４０号で開示されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２７２】

また、例えば、米国特許第５，０３４，５０６号で記載されるような、モルホリノ骨格構造を有する核酸も好適である。例えば、いくつかの実施形態では、対象の核酸は、リボース環の代わりに６員モルホリノ環を含む。これらの実施形態のうちのいくつかでは、ホスホロジアミダートまたは他の非ホスホジエステルヌクレオシド間連結が、ホスホジエステル連結を置き換える。

【０２７３】

リン原子を中に含まない好適な修飾ポリヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子及びアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、または１つ以上の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間連結により形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ連結（部分的にヌクレオシドの糖部分から形成される）を有するもの、シロキサン骨格、スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチ

ル及びチオホルムアセチル骨格、リボアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファミン酸塩骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、スルホン酸及びスルホンアミド骨格、アミド骨格、ならびに混合Ｎ、Ｏ、Ｓ及びCH_2構成要素部分を有する他のものが含まれる。

【０２７４】

模倣体

対象の核酸は、核酸模倣体であり得る。「模倣体」という用語は、ポリヌクレオチドに適用される場合、フラノース環のみまたはフラノース環及びヌクレオチド間連結の両方が、非フラノース基で置き換えられているポリヌクレオチドを含むことが意図され、フラノース環のみの置換はまた、当該技術分野で代理糖であると称される。複素環式塩基部分または修飾された複素環式塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために維持される。優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているポリヌクレオチド模倣体である、１つのそのような核酸は、ペプチド核酸（ＰＮＡ）と称される。ＰＮＡにおいて、ポリヌクレオチドの糖骨格は、骨格、特にアミノエチルグリシン骨格を含有するアミドで置き換えられている。ヌクレオチドは保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合している。

【０２７５】

優れたハイブリダイゼーション特性を有することが報告されている１つのポリヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸（ＰＮＡ）である。ＰＮＡ化合物中の骨格は、ＰＮＡにアミド含有骨格を与える２つ以上の連結されたアミノエチルグリシン単位である。複素環式塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合している。ＰＮＡ化合物の調製を記載する代表的な米国特許としては、米国特許第５，５３９，０８２号、同第５，７１４，３３１号、及び同第５，７１９，２６２号（それらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２７６】

研究されているポリヌクレオチド模倣体の別のクラスは、モルホリノ環に結合した複素環式塩基を有する連結されたモルホリノ単位（モルホリノ核酸）に基づいている。モルホリノ核酸中のモルホリノモノマー単位を連結する、いくつかの連結基が報告されている。非イオン性オリゴマー化合物を提供するために、１つのクラスの連結基が選択された。非イオン性モルホリノ系オリゴマー化合物は、細胞タンパク質との望まれない相互作用を有する可能性が低い。モルホリノ系ポリヌクレオチドは、細胞タンパク質との望まれない相互作用を形成する可能性が低いオリゴヌクレオチドの非イオン性模倣体である（Ｄｗａｉｎｅ Ａ．Ｂｒａａｓｃｈ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｒ．Ｃｏｒｅｙ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２００２，４１（１４），４５０３－４５１０）。モルホリノ系ポリヌクレオチドは、米国特許第５，０３４，５０６号に開示されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。モノマーサブユニットをつなげる様々な異なる連結基を有する、モルホリノクラスのポリヌクレオチド内の様々な化合物が調製されている。

【０２７７】

ポリヌクレオチド模倣体のさらなるクラスは、シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）と称される。ＤＮＡ／ＲＮＡ分子中に通常存在するフラノース環が、シクロヘキセニル環で置き換えられている。ＣｅＮＡ ＤＭＴ保護ホスホロアミダイトモノマーが調製され、古典的ホスホロアミダイト化学に従ったオリゴマー化合物合成のために使用されている。完全に修飾されたＣｅＮＡオリゴマー化合物、及び特定の位置がＣｅＮＡで修飾されたオリゴヌクレオチドが調製及び研究されている（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，２０００，１２２，８５９５－８６０２を参照されたい（その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる））。一般に、ＤＮＡ鎖へのＣｅＮＡモノマーの組み込みは、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドのその安定性を増加させる。ＣｅＮＡオリゴアデニレートは、天然の複合体と類似した安定性を有するＲＮＡ及びＤＮＡ相補鎖を有する複合体を形成した。ＣｅＮＡ構造を天然の核酸構造に組み込むことの研究は、容易な立体構造適応と共に進められることがＮＭＲ及び円二色性によって示された。

【０２７８】
さらなる修飾には、２’－ヒドロキシル基が糖環の４’炭素原子と連結され、それによって２’－Ｃ，４’－Ｃ－オキシメチレン連結を形成し、それによって二環式糖部分を形成する、ロックド核酸（ＬＮＡ）が含まれる。連結は、２’酸素原子及び４’炭素原子を架橋するメチレン（－CH_2－）基であり得、式中、ｎは、１または２である（Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．１９９８，４，４５５－４５６（その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる））。ＬＮＡ及びＬＮＡ類似体は、相補的ＤＮＡ及びＲＮＡでの非常に高い二重鎖熱安定性（Ｔｍ＝＋３～＋１０℃）、３’－エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、ならびに良好な溶解特性を示す。ＬＮＡを含有する強力かつ非毒性のアンチセンスオリゴヌクレオチドが記載されている（例えば、Ｗａｈｌｅｓｔｅｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，２０００，９７，５６３３－５６３８（その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる））。

【０２７９】
ＬＮＡモノマーのアデニン、シトシン、グアニン、５－メチル－シトシン、チミン、及びウラシルの合成及び調製が、それらのオリゴマー形成及び核酸認識特性と共に記載されている（例えば、Ｋｏｓｈｋｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，１９９８，５４，３６０７－３６３０（その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる））。ＬＮＡ及びその調製はまた、ＷＯ９８／３９３５２及びＷＯ９９／１４２２６、ならびに米国出願２０１２０１６５５１４、２０１００２１６９８３、２００９００４１８０９、２００６０１１７４１０、２００４００１４９５９、２００２００９４５５５、及び２００２００８６９９８にも記載されており、それらの開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０２８０】
修飾糖部分
対象の核酸はまた、１つ以上の置換された糖部分も含むことができる。好適なポリヌクレオチドは、ＯＨ；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－、もしくはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－、もしくはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－、もしくはＮ－アルキニル；またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキルから選択される糖置換基を含み、ここで、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換または非置換のＣ．ｓｕｂ．１～C_{10}アルキルまたはC_2～C_{10}アルケニル及びアルキニルであり得る。特に好適であるのは、$O((CH_2)_nO)_mCH_3$、$O(CH_2)_nOCH_3$、$O(CH_2)_nNH_2$、$O(CH_2)_nCH_3$、$O(CH_2)_nONH_2$、及び$O(CH_2)_nON((CH_2)_nCH_3)_2$であり、式中、ｎ及びｍは、１～約１０である。他の好適なポリヌクレオチドは、C_1～C_{10}低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、Ｏ－アルカリルもしくはＯ－アラルキル、ＳＨ、SCH_3、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬理学的特性を改善するための基、及び同様の特性を有する他の置換基から選択される糖置換基を含む。好適な修飾には、２’－メトキシエトキシ（２’－Ｏ－$CH_2CH_2OCH_3$（２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）または２’－ＭＯＥとしても知られる））（Ｍａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｅｌｖ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ，１９９５，７８，４８６－５０４（その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる））、すなわち、アルコキシアルコキシ基が含まれる。さらなる好適な修飾には、２’－ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、本明細書の下記の実施例において記載される、$O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$基（２’－ＤＭＡＯＥとしても知られる）、及び２’－ジメチルアミノエトキシエトキシ（当該技術分野で２’－Ｏ－ジメチル－アミノ－エトキシ－エチルまたは２’－ＤＭＡＥＯＥとしても知られる）、すなわち、２’－Ｏ－CH_2－Ｏ－CH_2－Ｎ（CH_3）$_2$が含まれる。

【０２８１】
他の好適な糖置換基には、メトキシ（－Ｏ－ＣＨ$_3$）、アミノプロポキシ（－－Ｏ　ＣＨ$_2$　ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$）、アリル（－ＣＨ$_2$－ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、－Ｏ－アリル（－－Ｏ－－ＣＨ$_2$－ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、及びフルオロ（Ｆ）が含まれる。２’－糖置換基は、アラビノ（上）位またはリボ（下）位にあってもよい。好適な２’－アラビノ修飾は、２’－Ｆである。類似の修飾がまた、オリゴマー化合物上の他の位置で、特に３’末端ヌクレオシド上のまたは２’－５’連結オリゴヌクレオチド内の糖の３’位、及び５’末端ヌクレオチドの５’位でなされもよい。オリゴマー化合物はまた、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分等の糖模倣体を有してもよい。

【０２８２】
塩基修飾及び置換
対象の核酸はまた、核酸塩基（当該技術分野で単に「塩基」と称されることが多い）の修飾または置換も含み得る。本明細書で使用される場合、「非修飾」または「天然」核酸塩基には、プリン塩基アデニン（Ａ）及びグアニン（Ｇ）、ならびにピリミジン塩基チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）、及びウラシル（Ｕ）が含まれる。修飾核酸塩基には、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、６－メチルならびにアデニン及びグアニンの他のアルキル誘導体、２－プロピルならびにアデニン及びグアニンの他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン及び２－チオシトシン、５－ハロウラシル及びシトシン、５－プロピニル（－Ｃ＝Ｃ－ＣＨ$_3$）ウラシル及びシトシンならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、シトシン及びチミン、５－ウラシル（プソイドウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシルならびに他の８置換アデニン及びグアニン、５－ハロ、特に５－ブロモ、５－トリフルオロメチルならびに他の５置換ウラシル及びシトシン、７－メチルグアニン及び７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン及び８－アザアデニン、７－デアザグアニン及び７－デアザアデニン、ならびに３－デアザグアニン及び３－デアザアデニンが含まれる。さらなる修飾核酸塩基には、三環式ピリミジン、例えば、フェノキサジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、Ｇ－クランプ、例えば、置換フェノキサジンシチジン（例えば、９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド（５，４－（ｂ）（１，４）ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド（４，５－ｂ）インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド（３’，２’：４，５）ピロロ（２，３－ｄ）ピリミジン－２－オン）が含まれる。

【０２８３】
複素環式塩基部分には、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、例えば、７－デアザ－アデニン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、及び２－ピリドンも含まれ得る。さらなる核酸塩基には、米国特許第３，６８７，８０８号に開示されるもの、Ｔｈｅ　Ｃｏｎｃｉｓｅ　Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ　Ｏｆ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ａｎｄ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，ｐａｇｅｓ　８５８－８５９，Ｋｒｏｓｃｈｗｉｔｚ，Ｊ．Ｉ．，ｅｄ．Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，１９９０に開示されるもの、Ｅｎｇｌｉｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ　Ｃｈｅｍｉｅ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９１，３０，６１３によって開示されるもの、及びＳａｎｇｈｖｉ，Ｙ．Ｓ．Ｃｈａｐｔｅｒ　１５，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐａｇｅｓ　２８９－３０２，Ｃｒｏｏｋｅ，Ｓ．Ｔ．ａｎｄ　Ｌｅｂｌｅｕ，Ｂ．，ｅｄ．，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，１９９３によって開示されるものが含まれ、それらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。これらの核酸塩基のうちのある特定のものは、オリゴマー化合物の結合親和性を増加させるのに有用である。これらには、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシル、及び５－プロピニルシトシンを含む、５置換ピリミ

ジン、６－アザピリミジン、ならびにＮ－２、Ｎ－６、及びＯ－６置換プリンが含まれる。５－メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を０．６～１．２℃増加させることが示されており（Ｓａｎｇｈｖｉ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ，１９９３，ｐｐ．２７６－２７８（その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる））、例えば、２’－Ｏ－メトキシエチル糖修飾と組み合わされる場合に、好適な塩基置換である。

【０２８４】

コンジュゲート

対象の核酸の別の可能な修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを向上させる１つ以上の部分またはコンジュゲートを、ポリヌクレオチドに化学的に連結することを伴う。これらの部分またはコンジュゲートは、１級または２級ヒドロキシル基等の官能基に共有結合したコンジュゲート基を含み得る。コンジュゲート基としては、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的特性を向上させる基、及びオリゴマーの薬物動態特性を向上させる基が挙げられるが、これらに限定されない。好適なコンジュゲート基としては、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び色素が挙げられる。薬力学的特性を向上させる基としては、取り込みを改善する、分解に対する耐性を向上させる、及び／または標的核酸との配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基が挙げられる。薬物動態特性を向上させる基としては、対象の核酸の取り込み、分布、代謝、または排泄を改善する基が挙げられる。

【０２８５】

コンジュゲート部分としては、コレステロール部分（Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８９，８６，６５５３－６５５６）、コール酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．，１９９４，４，１０５３－１０６０）、チオエーテル、例えば、ヘキシル－Ｓ－トリチルチオール（Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１９９２，６６０，３０６－３０９、Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．，１９９３，３，２７６５－２７７０）、チオコレステロール（Ｏｂｅｒｈａｕｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１９９２，２０，５３３－５３８）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基（Ｓａｉｓｏｎ－Ｂｅｈｍｏａｒａｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．，１９９１，１０，１１１１－１１１８、Ｋａｂａｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，１９９０，２５９，３２７－３３０、Ｓｖｉｎａｒｃｈｕｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ，１９９３，７５，４９－５４）、リン脂質、例えば、ジ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－３－Ｈ－ホスホネート（Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．，１９９５，３６，３６５１－３６５４、Ｓｈｅａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１９９０，１８，３７７７－３７８３）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ＆Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，１９９５，１４，９６９－９７３）、またはアダマンタン酢酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．，１９９５，３６，３６５１－３６５４）、パルミチル部分（Ｍｉｓｈｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１９９５，１２６４，２２９－２３７）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分（Ｃｒｏｏｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．，１９９６，２７７，９２３－９３７）等の脂質部分が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２８６】

コンジュゲートは、「タンパク質形質導入ドメイン」またはＰＴＤ（ＣＰＰ、すなわち細胞透過性ペプチドとしても知られる）を含んでよく、これは、脂質二層、ミセル、細胞膜、細胞小器官膜、もしくは小胞膜の横断を容易にするポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、または有機もしくは無機化合物を指し得る。小さな極性分子から大きな高分子の範囲であり得る別の分子、及び／またはナノ粒子に結合したＰＴＤは、例えば、細胞外空間から細胞内空間に、またはサイトゾルから細胞小器官（例えば、核）内に移動する分子の膜横断を容易にする。いくつかの実施形態では、ＰＴＤは、外因性ポリヌクレオチドの３’末端に共有結合している。いくつかの実施形態では、ＰＴＤは、外因性ポリヌクレオチドの５’末端に共有結合している。例示的なＰＴＤとしては、最小ウンデカペプチドタンパク質形質導入ドメイン（ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４０）を含むＨＩＶ－１　ＴＡＴの残基４７～５７に対応する）；細胞中への直接進入に十分ないくつかのアルギニン（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１０～５０個のアルギニン）を含むポリアルギニン配列；ＶＰ２２ドメイン（Ｚｅｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．９（６）：４８９－９６）；ショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）アンテナペディアタンパク質形質導入ドメイン（Ｎｏｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｄｉａｂｅｔｅｓ　５２（７）：１７３２－１７３７）；切断型ヒトカルシトニンペプチド（Ｔｒｅｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２１：１２４８－１２５６）；ポリリジン（Ｗｅｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：１３００３－１３００８）；ＲＲＱＲＲＴＳＫＬＭＫＲ（配列番号４１）；トランスポータンＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＧＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（配列番号４２）；ＫＡＬＡＷＥＡＫＬＡＫＡＬＡＫＡＬＡＫＨＬＡＫＡＬＡＫＡＬＫＣＥＡ（配列番号４３）；及びＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（配列番号４４）が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なＰＴＤとしては、ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４０）、ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４５）；３個のアルギニン残基～５０個のアルギニン残基のアルギニンホモポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なＰＴＤドメインのアミノ酸配列としては、以下、すなわちＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４０）、ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号４６）、ＹＡＲＡＡＡＲＱＡＲＡ（配列番号４７）、ＴＨＲＬＰＲＲＲＲＲＲ（配列番号４８）、及びＧＧＲＲＡＲＲＲＲＲＲ（配列番号４９）のうちのいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＰＴＤは、活性化可能なＣＰＰ（ＡＣＰＰ）である（Ａｇｕｉｌｅｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｉｎｔｅｇｒ　Ｂｉｏｌ（Ｃａｍｂ）Ｊｕｎｅ；１（５－６）：３７１－３８１）。ＡＣＰＰは、切断可能なリンカーを介して、一致するポリアニオン（例えば、Ｇｌｕ９または「Ｅ９」）につなげられたポリカチオン性ＣＰＰ（例えば、Ａｒｇ９または「Ｒ９」）を含み、これは正味電荷をほぼ０に還元し、それによって細胞への付着及び取り込みを阻害する。リンカーの切断時に、ポリアニオンが放出され、ポリアルギニン及びその本来の付着性を局所的にマスク解除し、このようにしてＡＣＰＰを「活性化して」膜を横断するようにする。

【０２８７】

標的細胞への構成要素の導入

Ｃａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡ（またはそれをコードするヌクレオチド配列を含む核酸）及び／または本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド（またはそれをコードするヌクレオチド配列を含む核酸）及び／または本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド（または本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸）及び／またはドナーポリヌクレオチド（ドナー鋳型）は、様々な周知の方法のうちのいずれかによって宿主細胞に導入され得る。

【０２８８】

様々な化合物及び方法のいずれかを使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達することができる（例えば、ここで、Ｃａｓ１２Ｌシステムは、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡ、ｂ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｃ）本開示のＣａｓ１２Ｌ

融合ポリペプチド及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａ、ｄ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、Ｃａｓ１２Ｌガイドｒｎａ、及びドナー鋳型核酸、ｅ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするｍｒｎａ、及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａ、ｆ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするｍｒｎａ、Ｃａｓ１２Ｌガイドｒｎａ、及びドナー鋳型核酸、ｇ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍｒｎａ、及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａ、ｈ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍｒｎａ、Ｃａｓ１２Ｌガイドｒｎａ、及びドナー鋳型核酸、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｊ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列、及びドナー鋳型核酸をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｋ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｌ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列、及びドナー鋳型核酸をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｍ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ｎ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ならびにドナー鋳型核酸、ｏ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ｐ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ならびにドナー鋳型核酸、ｑ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、第１のＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列、及び第２のＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、もしくはｒ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、第１のＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列、及び第２のＣａｓ１２Ｌガイドｒｎａをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、または（ａ）～（ｒ）のうちの１つの何らかの変形を含む）。非限定的な例として、本開示のＣａｓ１２Ｌシステムは、脂質と組み合わせることができる。別の非限定的な例として、本開示のＣａｓ１２Ｌシステムは、粒子と組み合わせることができるか、または粒子中に調合することができる。

【０２８９】

核酸を宿主細胞に導入する方法は、当該技術分野で既知であり、任意の簡便な方法を使用して、対象の核酸（例えば、発現構築物／ベクター）を標的細胞（例えば、原核細胞、真核細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、ヒト細胞等）に導入することができる。好適な方法としては、例えば、ウイルス感染、形質移入、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）媒介型形質移入、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介型形質移入、リポソーム媒介型形質移入、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈降、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介型核酸送達（例えば、Ｐａｎｙａｍ ｅｔ．，ａｌ Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．２０１２ Ｓｅｐ １３．ｐｉｉ：Ｓ０１６９－４０９Ｘ（１２）００２８３－９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ａｄｄｒ．２０１２．０９．０２３を参照されたい）等が挙げられる。

【０２９０】

場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ、プラスミド、発現ベクター、ウイルスベク

ター等）として提供される。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、タンパク質として（例えば、会合したガイドＲＮＡなしで、または会合ガイドＲＮＡと共に、すなわち、リボ核タンパク質複合体として）直接提供される。本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、任意の簡便な方法によって細胞に導入する（細胞に提供する）ことができ、そのような方法は、当業者に既知である。例示的な例として、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、細胞中に直接注入することができる（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡまたはＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする核酸の有無にかかわらず、及びドナーポリヌクレオチドの有無にかかわらず）。別の例として、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドとの予め形成された複合体を、細胞（例えば、真核細胞）に導入することができる（例えば、注入を介して、ヌクレオフェクションを介して；１つ以上の構成要素にコンジュゲートされた、例えば、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質にコンジュゲートされた、ガイドＲＮＡにコンジュゲートされた、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及びガイドＲＮＡにコンジュゲートされた、タンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）を介して等）。

【０２９１】

場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド（例えば、融合パートナーに融合されたｄＣａｓ１２Ｌ、融合パートナーに融合されたニッカーゼＣａｓ１２Ｌ等）は、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ、プラスミド、発現ベクター、ウイルスベクター等）として提供される。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、タンパク質として（例えば、会合したガイドＲＮＡなしで、または会合ガイドＲＮＡと共に、すなわち、リボ核タンパク質複合体として）直接提供される。本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、任意の簡便な方法によって細胞に導入する（細胞に提供する）ことができ、そのような方法は、当業者に既知である。例示的な例として、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、細胞中に直接注入することができる（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする核酸の有無にかかわらず、及びドナーポリヌクレオチドの有無にかかわらず）。別の例として、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドとＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（ＲＮＰ）との予め形成された複合体を、細胞に導入することができる（例えば、注入を介して、ヌクレオフェクションを介して；１つ以上の構成要素にコンジュゲートされた、例えば、Ｃａｓ１２Ｌ融合タンパク質にコンジュゲートされた、ガイドＲＮＡにコンジュゲートされた、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド及びガイドＲＮＡにコンジュゲートされた、タンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）を介して等）。

【０２９２】

場合によっては、核酸（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸等）は、粒子中で、または粒子と会合させて、細胞（例えば、標的宿主細胞）及び／またはポリペプチド（例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド）に送達される。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌシステムは、粒子中で、または粒子と会合させて細胞に送達される。「粒子」及び「ナノ粒子」という用語は、適宜、互換的に使用され得る。本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及び／またはＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むｍＲＮＡ、ならびにガイドＲＮＡは、粒子または脂質エンベロープを使用して同時に送達され得る。例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、例えば、複合体（例えば、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体）として、粒子、例えば、脂質またはリピドイド及び親水性ポリマー、例えば、カチオン性脂質及び親水性ポリマーを含む送達粒子を介して送達され得、例えば、ここで、カチオン性脂質は、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）もしくは１，２－ジテトラデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）を含み、及び／または親水性ポリマーは、エチレングリコールもしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含み、及び／または粒子は、コレステロールをさらに含む（例えば、製剤１から

の粒子＝ＤＯＴＡＰ　１００、ＤＭＰＣ　０、ＰＥＧ　０、コレステロール０；製剤番号２＝ＤＯＴＡＰ　９０、ＤＭＰＣ　０、ＰＥＧ　１０、コレステロール０；製剤番号３＝ＤＯＴＡＰ　９０、ＤＭＰＣ　０、ＰＥＧ　５、コレステロール５）。例えば、粒子は、多段階プロセスを使用して形成することができ、ここで、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、例えば、１：１モル比で、例えば、室温で、例えば、３０分間にわたって、例えば、滅菌のヌクレアーゼ不含の１倍リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で一緒に混合され、別個に、製剤の適用性に応じてＤＯＴＡＰ、ＤＭＰＣ、ＰＥＧ、及びコレステロールが、アルコール、例えば、１００％のエタノールに溶解させられ、これら２つの溶液が一緒に混合されて、複合体を含有する粒子を形成する。

【０２９３】

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド（または本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むｍＲＮＡ、または本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター）及び／またはＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（またはＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする１つ以上の発現ベクター等の核酸）は、粒子または脂質エンベロープを使用して同時に送達され得る。例えば、リン脂質二層シェルによって封入されたポリ（β－アミノエステル）（ＰＢＡＥ）コアを有する生分解性コアシェル構造ナノ粒子を使用することができる。場合によっては、自己集合生体付着性ポリマーに基づく粒子／ナノ粒子が使用され、そのような粒子／ナノ粒子は、例えば、脳へのペプチドの経口送達、ペプチドの静脈内送達、及びペプチドの経鼻送達に適用され得る。疎水性薬物の経口吸収及び眼内送達等の他の実施形態もまた企図される。保護され、疾患の部位に送達される操作されたポリマーエンベロープを伴う分子エンベロープ技術を使用することができる。約５ｍｇ／ｋｇの用量が、様々な要因、例えば、標的組織に応じて、単一または複数の用量で使用され得る。

【０２９４】

リピドイド化合物（例えば、米国特許出願２０１１／０２９３７０３に記載されるようなもの）もまた、ポリヌクレオチドの投与に有用であり、これを使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを送達することができる（例えば、ここで、Ｃａｓ１２Ｌシステムは、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｂ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｃ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｄ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｅ）本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｆ）本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｇ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｈ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｊ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及びドナー鋳型核酸をコードするヌクレオチド配列、ｋ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｌ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及びドナー鋳型核酸をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｍ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ｎ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベ

クター、ならびにドナー鋳型核酸、ｏ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ｐ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ならびにドナー鋳型核酸、ｑ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、第１のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及び第２のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、もしくはｒ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、第１のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及び第２のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、または（ａ）～（ｒ）のうちの１つの何らかの変形を含む）。一態様では、アミノアルコールリピドイド化合物は、細胞または対象に送達される薬剤と組み合わされて、マイクロ粒子、ナノ粒子、リポソーム、またはミセルを形成する。アミノアルコールリピドイド化合物は、他のアミノアルコールリピドイド化合物、ポリマー（合成または天然）、界面活性剤、コレステロール、炭水化物、脂質等と組み合わされて、粒子を形成し得る。次いで、これらの粒子は、任意選択で、薬学的賦形剤と組み合わされて、薬学的組成物を形成し得る。

【０２９５】

ポリ（ベータ－アミノアルコール）（ＰＢＡＡ）を使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達することができる。米国特許公開第２０１３０３０２４０１号は、コンビナトリアル重合を使用して調製されたポリ（ベータ－アミノアルコール）（ＰＢＡＡ）のクラスに関する。

【０２９６】

糖に基づく粒子が使用されてもよく、例えば、ＷＯ２０１４１１８２７２（参照により本明細書に組み込まれる）及びＮａｉｒ，Ｊ Ｋ ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆＡｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ １３６（４９），１６９５８－１６９６１）を参照して説明されるように、ＧａｌＮＡｃを使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達することができる。

【０２９７】

場合によっては、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する。ＲＮＡ等の負荷電ポリマーを、ＬＮＰ中に低ｐＨ値（例えば、ｐＨ４）で負荷してもよく、ここで、イオン化可能な脂質は、正電荷を示す。しかしながら、生理学的ｐＨ値において、ＬＮＰは、より長い循環時間と適合性の低い表面電荷を示す。イオン化可能なカチオン性脂質の４つの種、すなわち１，２－ジリネオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－ケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫＤＭＡ）、及び１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）に焦点が当てられている。ＬＮＰの調製は、例えば、Ｒｏｓｉｎ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １９：１２８６－２２００）に記載されている。カチオン性脂質１，２－ジリネオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２

－ＤＭＡ）、（３－ｏ－［２’’－（メトキシポリエチレングリコール２０００）スクシノイル］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリコール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）、及びＲ－３－［（．オメガ．－メトキシ－ポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリストイルオキシルプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ）を使用してもよい。核酸（例えば、ガイドＲＮＡ、本開示の核酸等）は、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ、及びＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡを（カチオン性脂質：ＤＳＰＣ：ＣＨＯＬ：ＰＥＧＳ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧを４０：１０：４０：１０のモル比で）含有するＬＮＰにカプセル化され得る。場合によっては、０．２％のＳＰ－ＤｉＯＣ１８が組み込まれる。

【０２９８】

球状核酸（ＳＮＡ（商標））構築物及び他のナノ粒子（特に金ナノ粒子）を使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達することができる。例えば、Ｃｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１１ １３３：９２５４－９２５７、Ｈａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｓｍａｌｌ．２０１１ ７：３１５８－３１６２、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１１ ５：６９６２－６９７０，Ｃｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２ １３４：１３７６－１３９１、Ｙｏｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．２０１２ １２：３８６７－７１、Ｚｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１２ １０９：１１９７５－８０、Ｍｉｒｋｉｎ，Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１２ ７：６３５－６３８ Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２ １３４：１６４８８－１６９１、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｎａｔｕｒｅ ２０１３ ４９５：Ｓ１４－Ｓ１６、Ｃｈｏｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１３ １１０（１９）：７６２５－７６３０、Ｊｅｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．５，２０９ｒａ１５２（２０１３）、及びＭｉｒｋｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｍａｌｌ，１０：１８６－１９２を参照されたい。

【０２９９】

ＲＮＡを有する自己集合ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の遠隔端に結合させたＡｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ（ＲＧＤ）ペプチドリガンドでＰＥＧ化されるポリエチレンイミン（ＰＥＩ）で構築され得る。

【０３００】

一般に、「ナノ粒子」は、１０００ｎｍ未満の直径を有する任意の粒子を指す。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する際に使用するのに好適なナノ粒子は、５００ｎｍ以下、例えば、２５ｎｍ～３５ｎｍ、３５ｎｍ～５０ｎｍ、５０ｎｍ～７５ｎｍ、７５ｎｍ～１００ｎｍ、１００ｎｍ～１５０ｎｍ、１５０ｎｍ～２００ｎｍ、２００ｎｍ～３００ｎｍ、３００ｎｍ～４００ｎｍ、または４００ｎｍ～５００ｎｍの直径を有する。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する際に使用するのに好適なナノ粒子は、２５ｎｍ～２００ｎｍの直径を有する。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する際に使用するのに好適なナノ粒子は、１００ｎｍ以下の直径を有する。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する際に使用するのに好適なナノ粒子は、３５ｎｍ～６０ｎｍの直径を有する。

【０３０１】

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示

のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する際に使用するのに好適なナノ粒子は、異なる形態で、例えば、固体ナノ粒子（例えば、銀、金、鉄、チタン等の金属）、非金属、脂質ベースの固体、ポリマー）、ナノ粒子の懸濁液、またはそれらの組み合わせとして提供され得る。金属、誘電体、及び半導体ナノ粒子、ならびにハイブリッド構造（例えば、コアシェルナノ粒子）が調製され得る。半導体材料で作製されたナノ粒子はまた、それらが電子エネルギーレベルの量子化が起こるのに十分に小さい場合（典型的に１０ｎｍ未満）、量子ドットと標示され得る。そのようなナノ粒子は、薬剤担体または造影剤等の生物医学的用途に使用され、本開示において類似の目的に適応され得る。

【０３０２】

半固体かつ軟質のナノ粒子もまた、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する際に使用するのに好適である。半固体性質のプロトタイプナノ粒子は、リポソームである。

【０３０３】

場合によっては、エキソソームを使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する。エキソソームは、ＲＮＡ及びタンパク質を輸送し、ＲＮＡを脳及び他の標的器官に送達することができる、内因性ナノ小胞である。

【０３０４】

場合によっては、リポソームを使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達する。リポソームは、内部水性区画を取り囲む単層または多層脂質二層、及び比較的不透過性の外側の親油性リン脂質二層で構成される球状小胞構造である。リポソームは、いくつかの異なる種類の脂質から作製され得るが、リポソームを作製するためにリン脂質が最も一般に使用される。リポソーム形成は、脂質膜が水溶液と混合されたときに自然に起こるが、それはまた、ホモジナイザー、超音波破砕機、または押出装置を使用することによる振とうの形態で力を加えることによって促進させることもできる。それらの構造及び特性を変更するために、いくつかの他の添加剤をリポソームに添加してもよい。例えば、リポソーム構造の安定化を助けるため、及びリポソーム内部カーゴの漏出を防止するために、コレステロールまたはスフィンゴミエリンのいずれかがリポソーム混合物に添加されてもよい。リポソーム製剤は、主に、１，２－ジステアロリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリン、及びモノシアロガングリオシド等の天然のリン脂質及び脂質で構成され得る。

【０３０５】

安定した核酸－脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）を使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達することができる。ＳＮＡＬＰ製剤は、脂質３－Ｎ－［（メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリストイルオキシ－プロピルアミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、及びコレステロールを、２：４０：１０：４８のモルパーセント比で含有し得る。ＳＮＡＬＰリポソームは、Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡ及びＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡを、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロール、及びｓｉＲＮＡと、２５：１の脂質／ｓｉＲＮＡ比及び４８／４０／１０／２モル比のコレステロール／Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡ／ＤＳＰＣ／ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡを使用して調合することによって調製され得る。結果として得られるＳＮＡＬＰリポソームは、約８０～１００ｎｍのサイズであり得る。ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．，ＵＳＡ）、ジパルミトイル

ホスファチジルコリン（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，Ａｌａ．，ＵＳＡ）、３－Ｎ－［（ｗ－メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリストイルオキシプロピルアミン、及びカチオン性１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎジメチルアミノプロパンを含み得る。ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ、及び１，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ；Ｎ－ジメチル）アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）を含み得る。

【０３０６】

アミノ脂質２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）等の他のカチオン性脂質を使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達することができる。以下の脂質組成、すなわち、それぞれ４０／１０／４０／１０モル比のアミノ脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロール、及び（Ｒ）－２，３－ビス（オクタデシルオキシ）プロピル－１－（メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）プロピルカルバメート（ＰＥＧ－脂質）、ならびにおよそ０．０５（ｗ／ｗ）のＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ／総脂質比を用いた、予め形成された小胞が企図され得る。７０～９０ｎｍの範囲の狭い粒径分布及び０．１１±０．０４（ｎ＝５６）の低い多分散指数を確実にするために、粒子は、ガイドＲＮＡを付加する前に８０ｎｍ膜を通して最大３回押し出され得る。非常に強力なアミノ脂質１６を含有する粒子が使用されてもよく、ここで、１６、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ－脂質の４つの脂質構成要素のモル比（５０／１０／３８．５／１．５）は、インビボ活性を強化するようにさらに最適化され得る。

【０３０７】

脂質は、本開示のＣａｓ１２Ｌシステムもしくはその構成要素（複数可）またはそれをコードする核酸と調合されて、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を形成し得る。好適な脂質としては、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ４、Ｃ１２－２００、及び共脂質ジステロイルホスファチジルコリン、コレステロールが挙げられるが、これらに限定されず、ＰＥＧ－ＤＭＧは、自発的な小胞形成手順を使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌシステムまたはその構成要素と調合され得る。構成要素のモル比は、約５０／１０／３８．５／１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡまたはＣ１２－２００／ジステロイルホスファチジルコリン／コレステロール／ＰＥＧ－ＤＭＧ）であり得る。

【０３０８】

本開示のＣａｓ１２Ｌシステムまたはその構成要素は、米国公開出願２０１３／０２５２２８１及び２０１３／０２４５１０７及び２０１３／０２４４２７９にさらに記載されるように、ＰＬＧＡ微小球にカプセル化されて送達され得る。

【０３０９】

超荷電タンパク質を使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達することができる。超荷電タンパク質は、異常に高い正または負の正味理論的電荷を有する操作されたまたは天然型タンパク質のクラスである。超負荷電タンパク質及び超正荷電タンパク質の両方が、熱的または化学的に誘導される凝集に耐える能力を示す。超正荷電タンパク質はまた、哺乳類細胞を透過することができる。カーゴをこれらのタンパク質、例えば、プラスミドＤＮＡ、ＲＮＡ、または他のタンパク質と会合させることは、インビトロ及びインビボの両方で、哺乳類細胞へのこれらの高分子の機能的送達を可能にすることができる。

【０３１０】

細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）を使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞に送達することができる。ＣＰＰは、典型的に、リジンも

しくはアルギニン等の高い相対的存在量の正荷電アミノ酸を含有するか、または極性／荷電アミノ酸と非極性疎水性アミノ酸との交互パターンを含有する配列を有するかのいずれかであるアミノ酸組成を有する。

【０３１１】

埋め込み型デバイスを使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする核酸、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする核酸、ドナー鋳型等）、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞（例えば、インビボの標的細胞（ここで、標的細胞は、循環中の標的細胞、組織中の標的細胞、器官内の標的細胞等である））に送達することができる。本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、本開示のＲＮＰ、本開示の核酸、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを標的細胞（例えば、インビボの標的細胞（ここで、標的細胞は、循環中の標的細胞、組織中の標的細胞、器官内の標的細胞等である））に送達する際に使用するのに好適な埋め込み型デバイスとしては、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、ＲＮＰ、またはＣａｓ１２Ｌシステム（もしくはその構成要素、例えば、本開示の核酸）を含む容器（例えば、リザーバ、マトリックス等）が挙げられ得る。

【０３１２】

好適な埋め込み型デバイスは、例えば、デバイス本体として使用されるマトリックス等のポリマー基質、及び場合によっては、金属または追加のポリマー等の追加の足場材料、ならびに可視性及び撮像を向上させる材料を含み得る。埋め込み型送達デバイスは、局所的かつ長期間にわたる放出を提供する際に有利であり得、ここで、送達されるポリペプチド及び／または核酸は、標的部位、例えば、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）、腫瘍を取り囲む血管系、罹患組織等に直接放出される。好適な埋め込み型デバイスとしては、生体安定性及び／または生分解性及び／または生体吸収性ポリマー基質（これは例えば、任意選択でマトリックスであり得る）を含む、腹腔等の腔への送達及び／または薬物送達系が係留もしくは取り付けられていない任意の他の種類の投与における使用に好適なデバイスが挙げられる。場合によっては、好適な埋め込み型薬物送達デバイスは、分解性ポリマーを含み、ここで、主な放出機序は、バルク浸食である。場合によっては、好適な埋め込み型薬物送達デバイスは、非分解性または分解の遅いポリマーを含み、ここで、主な放出機序は、バルク浸食ではなく拡散であり、それにより外側部分は膜として機能し、その内側部分は薬物貯留器として機能し、これは事実上、長期間（例えば、約１週間～約数ヶ月間）にわたって周囲の影響を受けない。異なる放出機序を有する異なるポリマーの組み合わせもまた、任意選択で使用されてもよい。濃度勾配は、総放出期間の顕著な期間中、実質的に一定に維持され得、したがって、拡散速度は実質的に一定である（「ゼロモード」拡散と称される）。「一定」という用語は、治療有効性の下限閾値を上回って維持されるが、依然として任意選択で初期バーストを特徴とし得る、及び／または変動し得る（例えば、ある特定の程度まで増加及び減少する）拡散速度を意味する。拡散速度は、長期間にわたってそのように維持することができ、治療有効期間、例えば、有効サイレンシング期間を最適化するために、ある特定のレベルで一定であると見なすことができる。

【０３１３】

場合によっては、埋め込み型送達系は、天然の化学物質、または対象の体内の酵素及び他の因子からの攻撃に起因するかにかかわらず、分解からヌクレオチド系治療剤を遮蔽するように設計される。

【０３１４】

デバイスの埋め込みのための部位、または標的部位は、最大の治療効果のために選択することができる。例えば、送達デバイスは、腫瘍環境または腫瘍に関連する血液供給内、またはその近位に埋め込むことができる。標的位置は、例えば、１）パーキンソン病またはアルツハイマー病における基底核、白質、及び灰白質のような変性部位での脳、２）筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）の場合のような脊椎、３）子宮頸部、４）活性及び慢性炎症

性関節、５）乾癬の場合のような真皮、７）鎮痛効果のための交感及び感覚神経部位、７）骨、８）急性または慢性感染の部位、９）膣内、１０）内耳－聴覚系、内耳の膜迷路、前庭系、１１）気管内、１２）心臓内、冠状部、心外膜、１３）尿路または膀胱、１４）胆道系、１５）腎臓、肝臓、脾臓を含むがこれらに限定されない実質組織、１６）リンパ節、１７）唾液腺、１８）歯肉、１９）関節内（関節中）、２０）眼内、２１）脳組織、２２）脳室、２３）腹腔を含む腔（例えば、限定されないが、卵巣癌の場合）、２４）食道内、ならびに２５）直腸内、ならびに２６）血管系中であり得る。

【０３１５】

埋め込み等の挿入の方法は、任意選択で、他の種類の組織埋め込みのため、及び／または挿入のため、及び／または組織試料採取のため、任意選択で変更なしに、または代替として、任意選択でそのような方法において主要でない変更のみと共に、既に使用されている場合がある。そのような方法としては、任意選択で、近接照射療法、生検、超音波を伴う及び／または伴わない内視鏡検査、例えば、脳組織への定位放射線法、関節、腹部器官、膀胱壁、及び体腔中への腹腔鏡の埋め込みを含む腹腔鏡検査が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３１６】

改変された宿主細胞

本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、及び／または本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、改変された細胞を提供する。本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドを含む改変された細胞を提供し、ここで、改変された細胞は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドを通常は含まない細胞である。本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、改変された細胞（例えば、遺伝子改変された細胞）を提供する。本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むｍＲＮＡで遺伝子改変される、遺伝子改変された細胞を提供する。本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクターで遺伝子改変される、遺伝子改変された細胞を提供する。本開示は、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｂ）本開示のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列とを含む、組み換え発現ベクターで遺伝子改変される、遺伝子改変された細胞を提供する。本開示は、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｂ）本開示のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列と、ｃ）ドナー鋳型をコードするヌクレオチド配列とを含む、組み換え発現ベクターで遺伝子改変される、遺伝子改変された細胞を提供する。

【０３１７】

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及び／または本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸及び／または本開示のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡのレシピエントとして機能する細胞は、例えば、インビトロ細胞、インビボ細胞、エクスビボ細胞、一次細胞、がん細胞、動物細胞、植物細胞、藻類細胞、真菌細胞等を含む様々な細胞のうちのいずれかであり得る。本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及び／または本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸及び／または本開示のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡのレシピエントとして機能する細胞は、「宿主細胞」または「標的細胞」と称される。宿主細胞または標的細胞は、本開示のＣａｓ１２Ｌシステムのレシピエントであり得る。宿主細胞または標的細胞は、本開示のＣａｓ１２Ｌ　ＲＮＰのレシピエントであり得る。宿主細胞または標的細胞は、本開示のＣａｓ１２Ｌシステムの単一構成要素のレシピエントであり得る。

【０３１８】

細胞（標的細胞）の非限定な例としては、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞真核生物の細胞、原生生物細胞、植物由来の細胞（例えば、植物作物、果物、野菜、穀物、大豆、トウモロコシ（ｃｏｒｎ）、トウモロコシ（ｍａｉｚｅ）、小麦、種、トマト、米、キャッサバ、サトウキビ、カボチャ、乾草、ジャガイモ、綿、カンナビス、

タバコ、顕花植物、球果植物、裸子植物、被子植物、シダ類、ヒカゲノカズラ類、ツノゴケ類、苔類コケ植物、苔類、双子葉植物、単子葉植物等由来の細胞）、藻類細胞（例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー（Ｂｏｔｒｙｏｃｏｃｃｕｓ　ｂｒａｕｎｉｉ）、コナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）、ナンノクロロプシス・ガディタナ（Ｎａｎｎｏｃｈｌｏｒｏｐｓｉｓ　ｇａｄｉｔａｎａ）、クロレラ・ピレノイドサ（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｐｙｒｅｎｏｉｄｏｓａ）、サルガッスム・パテンス（Ｓａｒｇａｓｓｕｍ　ｐａｔｅｎｓ）、Ｃ．アガード（Ｃ．ａｇａｒｄｈ）等）、海藻類（例えば、昆布）、真菌細胞（例えば、酵母細胞、キノコ由来の細胞）、動物細胞、無脊椎動物（例えば、ショウジョウバエ、蠕虫、棘皮動物、線形動物等）由来の細胞、脊椎動物（例えば、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、哺乳動物（例えば、有蹄類（例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ）、齧歯類（例えば、ラット、マウス）、非ヒト霊長類、ヒト、ネコ科動物（例えば、ネコ）、イヌ科動物（例えば、イヌ）等）由来の細胞等が挙げられる。場合によっては、細胞は、天然の生物に由来しない細胞である（例えば、細胞は、合成的に作製された細胞であり得、人工細胞とも称される）。

【０３１９】

細胞は、インビトロ細胞（例えば、樹立された培養細胞株）であり得る。細胞は、エクスビボ細胞（個体由来の培養細胞）であり得る。細胞は、インビボ細胞（例えば、個体内の細胞）であり得る。細胞は、単離された細胞であり得る。細胞は、生物の内部の細胞であり得る。細胞は、生物であり得る。細胞は、細胞培養物内の細胞（例えば、インビトロ細胞培養物）であり得る。細胞は、細胞の集団のうちの１つであり得る。細胞は、原核細胞であり得るか、または原核細胞に由来し得る。細胞は、細菌細胞であり得るか、または細菌細胞に由来し得る。細胞は、古細菌細胞であり得るか、または古細菌細胞に由来し得る。細胞は、真核細胞であり得るか、または真核細胞に由来し得る。細胞は、植物細胞であり得るか、または植物細胞に由来し得る。細胞は、動物細胞であり得るか、または動物細胞に由来し得る。細胞は、無脊椎動物細胞であり得るか、または無脊椎動物細胞に由来し得る。細胞は、脊椎動物細胞であり得るか、または脊椎動物に由来し得る。細胞は、哺乳類細胞であり得るか、または哺乳類細胞に由来し得る。細胞は、齧歯類細胞であり得るか、または齧歯類細胞に由来し得る。細胞は、ヒト細胞であり得るか、またはヒト細胞に由来し得る。細胞は、微生物細胞であり得るか、または微生物細胞に由来し得る。細胞は、真菌細胞であり得るか、または真菌細胞に由来し得る。細胞は、昆虫細胞であり得る。細胞は、節足動物細胞であり得る。細胞は、原生動物細胞であり得る。細胞は、蠕虫細胞であり得る。

【０３２０】

好適な細胞としては、幹細胞（例えば、胚性幹（ＥＳ）細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、生殖細胞（例えば、卵母細胞、精子、卵原細胞、精原細胞等）、体細胞、例えば、線維芽細胞、オリゴデンドロサイト、グリア細胞、造血細胞、ニューロン、筋細胞、骨細胞、肝細胞、膵細胞等が挙げられる。

【０３２１】

好適な細胞としては、ヒト胚性幹細胞、胎児心筋細胞、筋線維芽細胞、間葉系幹細胞、自家移植増殖心筋細胞、脂肪細胞、全能性細胞、多能性細胞、血液幹細胞、筋芽細胞、成体幹細胞、骨髄細胞、間葉系細胞、胚性幹細胞、実質細胞、上皮細胞、内皮細胞、中皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、外因性細胞、内因性細胞、幹細胞、造血幹細胞、骨髄由来の前駆細胞、心筋細胞、骨格細胞、胎児細胞、未分化細胞、多能性前駆細胞、単能性前駆細胞、単球、心筋芽細胞、骨格筋芽細胞、マクロファージ、毛細血管内皮細胞、異種細胞、同種細胞、及び出生後幹細胞が挙げられる。

【０３２２】

場合によっては、細胞は、免疫細胞、ニューロン、上皮細胞、及び内皮細胞、または幹細胞である。場合によっては、免疫細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、またはマクロファージである。場合によっては、免疫細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞である。場合によっては、免疫細胞は、ヘルパーＴ細胞である。場合によっては、

免疫細胞は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）である。

【０３２３】

場合によっては、細胞は、幹細胞である。幹細胞は、成体幹細胞を含む。成体幹細胞はまた、体性幹細胞とも称される。

【０３２４】

成体幹細胞は、分化組織に属するが、自己複製の特性、及び複数の細胞型、通常は幹細胞が見出される組織に典型的な細胞型を生じさせる能力を保持する。体性幹細胞の多くの例が当業者に既知であり、これには筋幹細胞、造血幹細胞、上皮幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、乳房幹細胞、腸幹細胞、中胚葉性幹細胞、内皮幹細胞、嗅覚幹細胞、神経堤幹細胞等が含まれる。

【０３２５】

関心対象の幹細胞としては、哺乳類幹細胞が挙げられ、ここで、「哺乳類」という用語は、ヒト、非ヒト霊長類、飼育動物及び家畜、ならびに動物園、実験室、競技用、または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等を含む哺乳動物として分類される任意の動物を指す。場合によっては、幹細胞は、ヒト幹細胞である。場合によっては、幹細胞は、齧歯類（例えば、マウス、ラット）幹細胞である。場合によっては、幹細胞は、非ヒト霊長類幹細胞である。

【０３２６】

幹細胞は、１つ以上の幹細胞マーカー、例えば、ＳＯＸ９、ＫＲＴ１９、ＫＲＴ７、ＬＧＲ５、ＣＡ９、ＦＸＹＤ２、ＣＤＨ６、ＣＬＤＮ１８、ＴＳＰＡＮ８、ＢＰＩＦＢ１、ＯＬＦＭ４、ＣＤＨ１７、及びＰＰＡＲＧＣ１Ａを発現し得る。

【０３２７】

いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞（ＨＳＣ）である。ＨＳＣは、骨髄、血液、臍帯血、胎児肝臓、及び卵黄嚢から単離され得る中胚葉由来の細胞である。ＨＳＣは、$CD34^+$及び$CD3^-$として特徴付けられる。ＨＳＣは、赤血球、好中球－マクロファージ、巨核球、及びリンパ球造血細胞系統をインビボで再配置させ得る。インビトロでは、ＨＳＣは、少なくともいくつかの自己複製細胞分裂を経るように誘導され得、インビボで見られるものと同じ系統に分化するように誘導され得る。したがって、ＨＳＣは、赤血球細胞、巨核球、好中球、マクロファージ、及びリンパ球細胞のうちの１つ以上に分化するように誘導され得る。

【０３２８】

他の実施形態では、幹細胞は、神経幹細胞（ＮＳＣ）である。神経幹細胞（ＮＳＣ）は、ニューロン及びグリア（オリゴデンドロサイト及び星状細胞を含む）に分化することが可能である。神経幹細胞は、多分裂の能力を有する多能性幹細胞であり、特定の条件下で、神経幹細胞である娘細胞、または神経芽細胞もしくは神経膠芽細胞であり得る神経前駆細胞、例えば、それぞれ１種以上のニューロン及びグリア細胞になるように方向付けられた細胞を生み出し得る。ＮＳＣを得る方法は、当該技術分野で既知である。

【０３２９】

他の実施形態では、幹細胞は、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）である。本来、胚性中胚葉に由来し、成体骨髄から単離されたＭＳＣは、分化して、筋肉、骨、軟骨、脂肪、骨髄基質、及び腱を形成することができる。ＭＳＣを単離する方法は、当該技術分野で既知であり、任意の既知の方法を使用して、ＭＳＣを得ることができる。例えば、ヒトＭＳＣの単離について記載している米国特許第５，７３６，３９６号を参照されたい。

【０３３０】

細胞は、場合によっては、植物細胞である。植物細胞は、単子葉植物の細胞であり得る。細胞は、双子葉植物の細胞であり得る。

【０３３１】

場合によっては、細胞は、植物細胞である。例えば、細胞は、主要な農業植物、例えば、大麦、豆（乾燥食用）、キャノーラ、トウモロコシ、綿（ピマ）、綿（アプランド）、アマニ、乾草（アルファルファ）、乾草（非アルファルファ）、オーツ麦、ピーナッツ、

米、モロコシ、大豆、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ（油）、ヒマワリ（非油）、サツマイモ、タバコ（バーレー）、タバコ（黄色種）、トマト、小麦（ダラム）、小麦（春）、小麦（冬）等の細胞であり得る。別の例として、細胞は、例えば、アルファルファスプラウト、アロエの葉、クズウコン、オモダカ、アーティチョーク、アスパラガス、筍、バナナの花、豆もやし、豆、ビーツの葉茎、ビーツ、ゴーヤ、チンゲンサイ、ブロッコリー、ブロッコリーレイブ（ラピーニ）、芽キャベツ、キャベツ、キャベツスプラウト、カクタスリーフ（ノパル）、カボチャ、カルドン、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハヤトウリ、チョロギ（クローヌ）、ハクサイ、キンサイ、ニラ、サイシン、シュンギク（ｔｕｎｇ　ｈｏ）、カラードグリーン、トウモロコシの茎、スイートコーン、キュウリ、ダイコン、食用タンポポの葉、タロイモ、豆苗（エンドウの葉）、トウキ（冬瓜）、ナス、エンダイブ、キクヂシャ、ゼンマイ、グンバイナズナ、フリゼ、カラシナ（チャイニーズマスタード）、カイラン、ガランガル（サイアム、タイ生ショウガ）、ニンニク、ショウガ、ゴボウ、グリーン、ハノーバーサラダグリーン、ウアウソントレ、エルサレムアーティチョーク、ヒカマ、ケールグリーン、コールラビ、アカザ（クェライト）、レタス（ビッブ）、レタス（ボストン）、レタス（ボストンレッド）、レタス（グリーンリーフ）、レタス（アイスバーグ）、レタス（サニーレタス）、レタス（オークリーフ・グリーン）、レタス（オークリーフ・レッド）、レタス（加工）、レタス（レッドリーフ）、レタス（ロメイン）、レタス（ルビーロメイン）、レタス（ロシアンレッドマスタード）、リンコック（ｌｉｎｋｏｋ）、ロボック、ササゲ、レンコン、マーシュ、マゲイ（アガベ）リーフ、ヤムイモ、メスクランミックス、水菜、モープ（ｍｏａｐ）（ヘチマ）、モー（ｍｏｏ）、モクア（ファジースクワッシュ）、キノコ、マスタード、長芋、オクラ、空芯菜、ネギ、ウポ（ｏｐｏ）（ロングスクワッシュ）、装飾トウモロコシ、装飾ヒョウタン、パセリ、パースニップ、豆、トウガラシ（ベルタイプ）、トウガラシ、カボチャ、ラディッキオ、ラディッシュの芽、ラディッシュ、レイプグリーン、レイプグリーン、ルバーブ、ロメイン（ベビーレッド）、ルタバガ、アッケシソウ（シービーン）、ヘチマ（トカド／トカドヘチマ）、ホウレンソウ、スクワッシュ、ストローベイル、サトウキビ、サツマイモ、スイスチャード、タマリンド、タロ、タロの葉、タロの芽、ターサイ、テペグアヘ（ｔｅｐｅｇｕａｊｅ）（ギンネム）、ティンドラ、トマティーヨ、トマト、トマト（チェリー）、トマト（グレープタイプ）、トマト（プラムタイプ）、ターメリック、カブの葉、カブ、ヒシの実、ヤンピ（ｙａｍｐｉ）、ヤム（ｎａｍｅｓ）、アブラナ、ユカ（キャッサバ）等を含むがこれらに限定されない、野菜作物の細胞である。

【０３３２】

場合によっては、植物細胞は、葉、幹、根、種子、花、花粉、葯、胚珠、小花柄、果実、分裂組織、子葉、胚軸、鞘、胚、胚乳、外植片、カルス、または新芽等の植物構成要素の細胞である。

【０３３３】

細胞は、場合によっては、節足動物細胞である。例えば、細胞は、例えば、鋏角類（Ｃｈｅｌｉｃｅｒａｔａ）、多足類（Ｍｙｒｉａｐｏｄｉａ）、六脚類（Ｈｅｘｉｐｏｄｉａ）、蛛形綱（Ａｒａｃｈｎｉｄａ）、昆虫綱（Ｉｎｓｅｃｔａ）、イシノミ目（Ａｒｃｈａｅｏｇｎａｔｈａ）、シミ目（Ｔｈｙｓａｎｕｒａ）、旧翅下綱（Ｐａｌａｅｏｐｔｅｒａ）、カゲロウ目（Ｅｐｈｅｍｅｒｏｐｔｅｒａ）、トンボ目（Ｏｄｏｎａｔａ）、不均翅亜目（Ａｎｉｓｏｐｔｅｒａ）、均翅亜目（Ｚｙｇｏｐｔｅｒａ）、新翅類（Ｎｅｏｐｔｅｒａ）、外翅類（Ｅｘｏｐｔｅｒｙｇｏｔａ）、カワゲラ目（Ｐｌｅｃｏｐｔｅｒａ）、シロアリモドキ目（Ｅｍｂｉｏｐｔｅｒａ）、バッタ目（Ｏｒｔｈｏｐｔｅｒａ）、絶翅目（Ｚｏｒａｐｔｅｒａ）、ハサミムシ目（Ｄｅｒｍａｐｔｅｒａ）、網翅目（Ｄｉｃｔｙｏｐｔｅｒａ）、ガロアムシ目（Ｎｏｔｏｐｔｅｒａ）、コオロギモドキ科（Ｇｒｙｌｌｏｂｌａｔｔｉｄａｅ）、マントファスマ科（Ｍａｎｔｏｐｈａｓｍａｔｉｄａｅ）、ナナフシ目（Ｐｈａｓｍａｔｏｄｅａ）、ゴキブリ類（Ｂｌａｔｔａｒｉａ）、シロアリ目（Ｉｓｏｐｔｅｒａ）、カマキリ目（Ｍａｎｔｏｄｅａ）、パラプネウロプテラ（Ｐａｒａｐｎｅｕｒｏｐｔｅｒａ）、チャタテムシ目（Ｐｓｏｃｏｐｔｅｒａ）、

アザミウマ目（Ｔｈｙｓａｎｏｐｔｅｒａ）、シラミ目（Ｐｈｔｈｉｒａｐｔｅｒａ）、カメムシ目（Ｈｅｍｉｐｔｅｒａ）、内翅類（Ｅｎｄｏｐｔｅｒｙｇｏｔａ）もしくは完全変態類（Ｈｏｌｏｍｅｔａｂｏｌａ）、ハチ目（Ｈｙｍｅｎｏｐｔｅｒａ）、コウチュウ目（Ｃｏｌｅｏｐｔｅｒａ）、ネジレバネ目（Ｓｔｒｅｐｓｉｐｔｅｒａ）、ラクダムシ目（Ｒａｐｈｉｄｉｏｐｔｅｒａ）、広翅目（Ｍｅｇａｌｏｐｔｅｒａ）、脈翅目（Ｎｅｕｒｏｐｔｅｒａ）、シリアゲムシ目（Ｍｅｃｏｐｔｅｒａ）、ノミ類（Ｓｉｐｈｏｎａｐｔｅｒａ）、双翅目（Ｄｉｐｔｅｒａ）、毛翅目（Ｔｒｉｃｈｏｐｔｅｒａ）、または鱗翅目（Ｌｅｐｉｄｏｐｔｅｒａ）の亜目、科、亜科、群、下位群、または種の細胞であり得る。

【０３３４】

細胞は、場合によっては、昆虫細胞である。例えば、場合によっては、細胞は、蚊、バッタ、半翅類、ハエ、ノミ、ミツバチ、スズメバチ、アリ、シラミ、蛾、またはカブトムシの細胞である。

【０３３５】

キット

本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌシステム、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムの構成要素を含むキットを提供する。

【０３３６】

本開示のキットは、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡ、ｂ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｃ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｄ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｅ）本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｆ）本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｇ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ｈ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナー鋳型核酸、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｊ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及びドナー鋳型核酸をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｋ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｌ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及びドナー鋳型核酸をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、ｍ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ｎ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ならびにドナー鋳型核酸、ｏ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ｐ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第１の組み換え発現ベクター、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む第２の組み換え発現ベクター、ならびにドナー鋳型核酸、ｑ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、第１のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列、及び第２のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、もしくはｒ）本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、第１のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレ

オチド配列、及び第２のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え発現ベクター、または（ａ）～（ｒ）のうちの１つの何らかの変形を含み得る。

【０３３７】

本開示のキットは、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌシステムの上述の構成要素、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを含み得る構成要素と、ｂ）１つ以上の追加の試薬、例えば、ｉ）緩衝液、ｉｉ）プロテアーゼ阻害剤、ｉｉｉ）ヌクレアーゼ阻害剤、ｉｖ）検出可能な標識を現像または可視化するために必要とされる試薬、ｖ）陽性及び／または陰性対照の標的ＤＮＡ、ｖｉ）陽性及び／または陰性対照のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ等とを含み得る。本開示のキットは、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌシステムの上述の構成要素、または本開示のＣａｓ１２Ｌシステムを含み得る構成要素と、ｂ）治療剤とを含み得る。

【０３３８】

本開示のキットは、ａ）標的核酸中の標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズするＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡの部分をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を挿入するための挿入部位と、ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡのＣａｓ１２Ｌ結合部分をコードするヌクレオチド配列とを含む、組み換え発現ベクターを含み得る。本開示のキットは、ａ）標的核酸中の標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズするＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡの部分をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を挿入するための挿入部位と、ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡのＣａｓ１２Ｌ結合部分をコードするヌクレオチド配列と、ｃ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とを含む、組み換え発現ベクターを含み得る。

【０３３９】

有用性

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、または本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、様々な方法において（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡと組み合わせて、場合によってはドナー鋳型とさらに組み合わせて）利用される。例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドを使用して、（ｉ）標的核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ、一本鎖または二本鎖）を修飾する（例えば、切断する、例えば、ニッキングする、メチル化する等）、（ｉｉ）標的核酸の転写を調節する、（ｉｉｉ）標的核酸を標識する、（ｉｖ）標的核酸に（例えば、単離、標識化、撮像、追跡等の目的で）結合する、（ｖ）標的核酸と会合したポリペプチド（例えば、ヒストン）を修飾することができる。したがって、本開示は、標的核酸を修飾する方法を提供する。場合によっては、標的核酸を修飾するための本開示の方法は、標的核酸を、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、及びｂ）１つ以上（例えば、２つ）のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡと接触させることを含む。場合によっては、標的核酸を修飾するための本開示の方法は、標的核酸を、ａ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びｃ）ドナー核酸（例えば、ドナー鋳型）と接触させることを含む。場合によっては、接触ステップは、インビトロの細胞で実行される。場合によっては、接触ステップは、インビボの細胞で実行される。場合によっては、接触ステップは、エクスビボの細胞で実行される。

【０３４０】

Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドを使用する方法は、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドを標的核酸中の特定の領域に（会合したＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡによってそこで標的とされることによって）結合させることを含むため、これらの方法は、一般に本明細書において、結合方法（例えば、標的核酸の結合方法）と称される。しかしながら、場合によっては、結合方法は、標的核酸の結合以外は何ももたらさない場合があるが、他の場合では、この方法は、異なる最終結果を有し得る（例えば、この方法は、標的核酸の修飾、例えば、切断／メチル化等；標的核酸からの転写の調節；標的核酸の翻訳の調節；ゲノム編集；標的核酸と会合したタンパク質の調節；標的核酸の単離等をもたらし得る）ことを理解されたい。

【０３４１】

好適な方法の例については、例えば、Ｊｉｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１２　Ａｕｇ　１７；３３７（６０９６）：８１６－２１、Ｃｈｙｌｉｎｓｋｉ　ｅｔ

al.，RNA Biol.2013 May；10（5）：726－37、Ma et al.，Biomed Res Int.2013；2013：270805、Hou et al.，Proc Natl Acad Sci U S A.2013 Sep 24；110（39）：15644－9、Jinek et al.，Elife.2013；2：e00471、Pattanayak et al.，Nat Biotechnol.2013 Sep；31（9）：839－43、Qi et al，Cell.2013 Feb 28；152（5）：1173－83、Wang et al.，Cell.2013 May 9；153（4）：910－8、Auer et al.，Genome Res.2013 Oct 31、Chen et al.，Nucleic Acids Res.2013 Nov 1；41（20）：e19、Cheng et al.，Cell Res.2013 Oct；23（10）：1163－71、Cho et al.，Genetics.2013 Nov；195（3）：1177－80、DiCarlo et al.，Nucleic Acids Res.2013 Apr；41（7）：4336－43、Dickinson et al.，Nat Methods.2013 Oct；10（10）：1028－34、Ebina et al.，Sci Rep.2013；3：2510、Fujii et al，Nucleic Acids Res.2013 Nov 1；41（20）：e187、Hu et al.，Cell Res.2013 Nov；23（11）：1322－5、Jiang et al.，Nucleic Acids Res.2013 Nov 1；41（20）：e188、Larson et al.，Nat Protoc.2013 Nov；8（11）：2180－96、Mali et.at.，Nat Methods.2013 Oct；10（10）：957－63、Nakayama et al.，Genesis.2013Dec；51（12）：835－43、Ran et al.，Nat Protoc.2013 Nov；8（11）：2281－308、Ran et al.，Cell.2013 Sep 12；154（6）：1380－9、Upadhyay et al.，G3（Bethesda）.2013 Dec 9；3（12）：2233－8、Walsh et al.，Proc Natl Acad Sci U S A.2013 Sep 24；110（39）：15514－5、Xie et al.，Mol Plant.2013 Oct 9、Yang et al.，Cell.2013 Sep 12；154（6）：1370－9、ならびに米国特許及び特許出願8，906，616、8，895，308、8，889，418、8，889，356、8，871，445、8，865，406、8，795，965、8，771，945、8，697，359、20140068797、20140170753、20140179006、20140179770、20140186843、20140186919、20140186958、20140189896、20140227787、20140234972、20140242664、20140242699、20140242700、20140242702、20140248702、20140256046、20140273037、20140273226、20140273230、20140273231、20140273232、20140273233、20140273234、20140273235、20140287938、20140295556、20140295557、20140298547、20140304853、20140309487、20140310828、20140310830、20140315985、20140335063、20140335620、20140342456、20140342457、20140342458、20140349400、20140349405、20140356867、20140356956、20140356958、20140356959、20140357523、20140357530、20140364333、及び20140377868を参照されたく、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に含まれる。

【0342】

例えば、本開示は、標的核酸を切断する方法、標的核酸を編集する方法、標的核酸から

の転写を調節する方法、標的核酸を単離する方法、標的核酸を結合する方法、標的核酸を撮像する方法、標的核酸を修飾する方法等を提供する（ただし、これらに限定されない）。

【０３４３】

本明細書で使用される場合、「標的核酸を接触させる」、及び、例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドと、またはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド等と「標的核酸を接触させる」という用語／表現は、標的核酸を接触させるための全ての方法を包含する。例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、タンパク質、（Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする）ＲＮＡ、または（Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする）ＤＮＡとして細胞に提供され得るが、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡとして、またはガイドＲＮＡをコードする核酸として提供され得る。したがって、例えば、細胞中（例えば、インビトロで細胞の内部、インビボで細胞の内部、エクスビボで細胞の内部）で方法を行う場合、標的核酸を接触させることを含む方法は、活性／最終状態にある（例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドのタンパク質（複数可）の形態の、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドのタンパク質の形態の、場合によってはガイドＲＮＡに対するＲＮＡの形態の）構成要素のうちのいずれかまたは全ての、細胞への導入を包含し、また、構成要素のうちの１つ以上をコードする１つ以上の核酸（例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドまたはｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（複数可）を含む核酸（複数可）、ガイドＲＮＡ（複数可）をコードするヌクレオチド配列（複数可）を含む核酸（複数可）、ドナー鋳型をコードするヌクレオチド配列を含む核酸等）の、細胞への導入を包含する。これらの方法はまた、細胞の外部で、インビトロで行うこともできるため、標的核酸を接触させることを含む方法は、（別途明記されない限り）インビトロで細胞の外部、インビトロで細胞の内部、インビボで細胞の内部、エクスビボで細胞の内部等で接触させることを包含する。

【０３４４】

場合によっては、標的核酸を修飾するための本開示の方法は、標的細胞に、Ｃａｓ１２Ｌ座位、例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ならびにＣａｓ１２Ｌ座位を含む細胞からのＣａｓ１２Ｌコードヌクレオチド配列を取り囲む約１キロベース（ｋｂ）～５ｋｂの長さのヌクレオチド配列を含む核酸を導入することを含み（例えば、場合によっては、その自然状態（それが自然界で存在する状態）にある細胞はＣａｓ１２Ｌ座位を含む）、ここで、標的細胞は、通常（その自然状態で）Ｃａｓ１２Ｌ座位を含まない。しかしながら、コードされたｃｒＲＮＡ（複数可）のためのガイド配列をコードする１つ以上のスペーサー配列は、１つの以上の関心対象の標的配列が標的とされるように改変され得る。したがって、例えば、場合によっては、標的核酸を修飾するための本開示の方法は、標的細胞に、Ｃａｓ１２Ｌ座位、例えば、供給源細胞から得られた核酸を導入することを含み（例えば、場合によっては、その自然状態（それが自然界で存在する状態）にある細胞はＣａｓ１２Ｌ座位を含む）、ここで、核酸は、１００ヌクレオチド（ｎｔ）～５ｋｂの長さ（例えば、１００ｎｔ～５００ｎｔ、５００ｎｔ～１ｋｂ、１ｋｂ～１．５ｋｂ、１．５ｋｂ～２ｋｂ、２ｋｂ～２．５ｋｂ、２．５ｋｂ～３ｋｂ、３ｋｂ～３．５ｋｂ、３．５ｋｂ～４ｋｂ、または４ｋｂ～５ｋｂの長さ）を有し、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。上述したように、場合によっては、コードされたｃｒＲＮＡ（複数可）のためのガイド配列をコードする１つ以上のスペーサー配列は、１つの以上の関心対象の標的配列が標的とされるように改変され得る。場合によっては、この方法は、標的細胞に、ｉ）Ｃａｓ１２Ｌ座位と、ｉｉ）ドナーＤＮＡ鋳型とを導入することを含む。場合によっては、標的核酸は、インビトロの無細胞組成物中にある。場合によっては、標的核酸は、標的細胞中に存在する。場合によっては、標的核酸は、標的細胞中に存在し、ここで、標的細胞は、原核細胞である。場合によっては、標的核酸は、標的細胞中に存在し、ここで、標的細胞は、真核細胞である。場合によっては、標的核酸は、標的細胞中に存在し、ここで、標的細胞は、哺乳類細胞である。場合によっては、標的核酸は、標的細胞中に存在し、ここで、標的細胞は、植物細胞である。

【０３４５】

場合によっては、標的核酸を修飾するための本開示の方法は、標的核酸を、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと、または本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドと接触させることを含む。場合によっては、標的核酸を修飾するための本開示の方法は、標的核酸を、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡと接触させることを含む。場合によっては、標的核酸を修飾するための本開示の方法は、標的核酸を、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、第１のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及び第２のＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡと接触させることを含む。場合によっては、標的核酸を修飾するための本開示の方法は、標的核酸を、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びドナーＤＮＡ鋳型と接触させることを含む。

【０３４６】

関心対象の標的核酸及び標的細胞

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、または本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドは、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡに結合している場合、標的核酸に結合することができ、場合によっては、標的核酸に結合し、それを修飾することができる。標的核酸は、任意の核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）であり得、二本鎖または一本鎖であり得、任意の種類の核酸（例えば、染色体（ゲノムＤＮＡ）、染色体由来、染色体ＤＮＡ、プラスミド、ウイルス、細胞外、細胞内、ミトコンドリア、葉緑体、線状、環状等）であり得、任意の生物に由来し得る（例えば、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、標的核酸中の標的配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含み、それにより標的核酸が標的とされ得る限り）。

【０３４７】

標的核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得る。標的核酸は、二本鎖（例えば、ｄｓＤＮＡ、ｄｓＲＮＡ）または一本鎖（例えば、ｓｓＲＮＡ、ｓｓＤＮＡ）であり得る。場合によっては、標的核酸は、一本鎖である。場合によっては、標的核酸は、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）である。場合によっては、標的ｓｓＲＮＡ（例えば、標的細胞ｓｓＲＮＡ、ウイルスｓｓＲＮＡ等）は、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、長い非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）、及びマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）から選択される。場合によっては、標的核酸は、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）（例えば、ウイルスＤＮＡ）である。上述したように、場合によっては、標的核酸は、一本鎖である。

【０３４８】

標的核酸は、任意の場所、例えば、インビトロで細胞の外部、インビトロで細胞の内部、インビボで細胞の内部、エクスビボで細胞の内部に位置し得る。好適な標的細胞（ゲノムＤＮＡ等の標的核酸を含み得る）としては、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞真核生物の細胞、植物細胞、藻類細胞、例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー、コナミドリムシ、ナンノクロロプシス・ガディタナ、クロレラ・ピレノイドサ、サルガッスム・パテンス、Ｃ．アガード等、真菌細胞（例えば、酵母細胞）、動物細胞、無脊椎動物（例えば、ショウジョウバエ、蠕虫、棘皮動物、線形動物等）由来の細胞、昆虫（例えば、蚊、ミツバチ、農業害虫等）の細胞、クモ類（例えば、クモ、ダニ等）の細胞、脊椎動物（例えば、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、哺乳動物由来の細胞（例えば、齧歯類由来の細胞、ヒト由来の細胞、非ヒト哺乳動物の細胞、齧歯類（例えば、マウス、ラット）の細胞、ウサギ類（例えば、ウサギ）の細胞、有蹄類（例えば、ウシ、ウマ、ラクダ、ラマ、ビクーニャ、ヒツジ、ヤギ等）の細胞、海洋哺乳動物（例えば、クジラ、アザラシ、ゾウアザラシ、イルカ、アシカ等）の細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。任意の種類の細胞が関心対象であり得る（例えば、幹細胞、例えば、胚性幹（ＥＳ）細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、生殖細胞（例えば、卵母細胞、精子、卵原細胞、精原細胞等）、成体細胞、体細胞、例えば、線維芽細胞、造血細胞、ニューロン、筋細胞、骨細胞、肝細胞、膵細胞、任意の期にある胚のインビトロまたはインビボの胚細胞、例えば、１細胞期、２細胞期、４細胞期、８細胞期等のゼブラフィッシュ胚等）。

【０３４９】

細胞は、樹立された細胞株に由来し得るか、またはそれらは一次細胞であってもよく、「一次細胞」、「一次細胞株」、及び「一次培養物」は、本明細書では、対象に由来し、

インビトロで培養物の限定数の継代、すなわち分裂にわたって増殖させた細胞及び細胞培養物を指すように互換的に使用される。例えば、一次培養物は、０回、１回、２回、４回、５回、１０回、または１５回であるが、クライシス期を経るには十分でない回数継代された場合がある培養物である。典型的には、一次細胞株は、インビトロで１０継代未満にわたって維持される。標的細胞は、単細胞生物であり得、及び／または培養物中で増殖し得る。細胞が一次細胞である場合、それらは任意の簡便な方法によって個体から採取され得る。例えば、白血球は、アフェレーシス、白血球アフェレーシス、密度勾配分離等によって簡便に採取され得る一方、例えば、皮膚、筋肉、骨髄、脾臓、肝臓、膵臓、肺、腸、胃等の組織由来の細胞は、生検によって簡便に採取することができる。

【０３５０】

上記の用途のうちのいくつかにおいて、対象の方法を用いて、インビボで及び／またはエクスビボで及び／またはインビトロで、有糸分裂細胞または有糸分裂後の細胞中で標的核酸切断、標的核酸修飾を誘導する、及び／または標的核酸に結合する（例えば、可視化のため、収集及び／または分析のため等）ことができる（例えば、標的とされたｍＲＮＡによってコードされるタンパク質の生成を妨害するため、標的ＤＮＡを切断するかまたは他の方法で修飾するため、標的細胞を遺伝子改変するため等）。ガイドＲＮＡは、標的核酸にハイブリダイズすることによって特異性を提供するため、開示される方法における関心対象の有糸分裂細胞及び／または有糸分裂後の細胞は、任意の生物由来の細胞（例えば、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞真核生物の細胞、植物細胞、藻類細胞、例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー、コナミドリムシ、ナンノクロロプシス・ガディタナ、クロレラ・ピレノイドサ、サルガッスム・パテンス、Ｃ．アガード等、真菌細胞（例えば、酵母細胞）、動物細胞、無脊椎動物（例えば、ショウジョウバエ、蠕虫、棘皮動物、線形動物等）由来の細胞、脊椎動物（例えば、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、哺乳動物由来の細胞、齧歯類由来の細胞、ヒト由来の細胞等）を含み得る。場合によっては、対象のＣａｓ１２Ｌタンパク質（及び／またはＤＮＡ及び／またはＲＮＡ等のタンパク質をコードする核酸）及び／またはＣａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡ（及び／またはガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）、及び／またはドナー鋳型、及び／またはＲＮＰは、個体（例えば、哺乳動物、ラット、マウス、ブタ、霊長類、非ヒト霊長類、ヒト等）に導入され得る（すなわち、標的細胞はインビボにあり得る）。場合によっては、そのような投与は、例えば、標的とされた細胞のゲノムを編集することによって、疾患を治療する及び／または予防する目的のためであり得る。

【０３５１】

植物細胞には、単子葉植物の細胞、及び双子葉植物の細胞が含まれる。細胞は、根細胞、葉細胞、木部の細胞、師部の細胞、形成層の細胞、頂端分裂組織細胞、実質細胞、厚角組織細胞、厚壁組織細胞等であり得る。植物細胞としては、農業作物、例えば小麦、トウモロコシ、米、モロコシ、キビ、大豆等の細胞が挙げられる。植物細胞としては、農業果物及びナッツ植物、例えば、アプリコット、オレンジ、レモン、リンゴ、プラム、ナシ、アーモンド等を生み出す植物の細胞が挙げられる。

【０３５２】

標的細胞の追加の例は、「改変された細胞」と題される上記の節に列記される。細胞（標的細胞）の非限定な例としては、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞真核生物の細胞、原生生物細胞、植物由来の細胞（例えば、植物作物、果物、野菜、穀物、大豆、トウモロコシ（ｃｏｒｎ）、トウモロコシ（ｍａｉｚｅ）、小麦、種、トマト、米、キャッサバ、サトウキビ、カボチャ、乾草、ジャガイモ、綿、カンナビス、タバコ、顕花植物、球果植物、裸子植物、被子植物、シダ類、ヒカゲノカズラ類、ツノゴケ類、苔類コケ植物、苔類、双子葉植物、単子葉植物等由来の細胞等）、藻類細胞（例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー、コナミドリムシ、ナンノクロロプシス・ガディタナ、クロレラ・ピレノイドサ、サルガッスム・パテンス、Ｃ．アガード等）、海藻類（例えば、昆布）、真菌細胞（例えば、酵母細胞、キノコ由来の細胞）、動物細胞、無脊椎動物（例えば、ショウジョウバエ、蠕虫、棘皮動物、線形動物等）由来の細胞、脊椎動物（例えば、魚

類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、哺乳動物（例えば、有蹄類（例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ）、齧歯類（例えば、ラット、マウス）、非ヒト霊長類、ヒト、ネコ科動物（例えば、ネコ）、イヌ科動物（例えば、イヌ）等）由来の細胞等が挙げられる。場合によっては、細胞は、天然の生物に由来しない細胞である（例えば、細胞は、合成的に作製された細胞であり得、人工細胞とも称される）。

【０３５３】

細胞は、インビトロ細胞（例えば、樹立された培養細胞株）であり得る。細胞は、エクスビボ細胞（個体由来の培養細胞）であり得る。細胞は、インビボ細胞（例えば、個体内の細胞）であり得る。細胞は、単離された細胞であり得る。細胞は、生物の内部の細胞であり得る。細胞は、生物であり得る。細胞は、細胞培養物内の細胞（例えば、インビトロ細胞培養物）であり得る。細胞は、細胞の集団のうちの１つであり得る。細胞は、原核細胞であり得るか、または原核細胞に由来し得る。細胞は、細菌細胞であり得るか、または細菌細胞に由来し得る。細胞は、古細菌細胞であり得るか、または古細菌細胞に由来し得る。細胞は、真核細胞であり得るか、または真核細胞に由来し得る。細胞は、植物細胞であり得るか、または植物細胞に由来し得る。細胞は、動物細胞であり得るか、または動物細胞に由来し得る。細胞は、無脊椎動物細胞であり得るか、または無脊椎動物細胞に由来し得る。細胞は、脊椎動物細胞であり得るか、または脊椎動物に由来し得る。細胞は、哺乳類細胞であり得るか、または哺乳類細胞に由来し得る。細胞は、齧歯類細胞であり得るか、または齧歯類細胞に由来し得る。細胞は、ヒト細胞であり得るか、またはヒト細胞に由来し得る。細胞は、微生物細胞であり得るか、または微生物細胞に由来し得る。細胞は、真菌細胞であり得るか、または真菌細胞に由来し得る。細胞は、昆虫細胞であり得る。細胞は、節足動物細胞であり得る。細胞は、原生動物細胞であり得る。細胞は、蠕虫細胞であり得る。

【０３５４】

好適な細胞としては、幹細胞（例えば、胚性幹（ＥＳ）細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、生殖細胞（例えば、卵母細胞、精子、卵原細胞、精原細胞等）、体細胞、例えば、線維芽細胞、オリゴデンドロサイト、グリア細胞、造血細胞、ニューロン、筋細胞、骨細胞、肝細胞、膵細胞等が挙げられる。

【０３５５】

好適な細胞としては、ヒト胚性幹細胞、胎児心筋細胞、筋線維芽細胞、間葉系幹細胞、自家移植増殖心筋細胞、脂肪細胞、全能性細胞、多能性細胞、血液幹細胞、筋芽細胞、成体幹細胞、骨髄細胞、間葉系細胞、胚性幹細胞、実質細胞、上皮細胞、内皮細胞、中皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、外因性細胞、内因性細胞、幹細胞、造血幹細胞、骨髄由来の前駆細胞、心筋細胞、骨格細胞、胎児細胞、未分化細胞、多能性前駆細胞、単能性前駆細胞、単球、心筋芽細胞、骨格筋芽細胞、マクロファージ、毛細血管内皮細胞、異種細胞、同種細胞、及び出生後幹細胞が挙げられる。

【０３５６】

場合によっては、細胞は、免疫細胞、ニューロン、上皮細胞、及び内皮細胞、または幹細胞である。場合によっては、免疫細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、またはマクロファージである。場合によっては、免疫細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞である。場合によっては、免疫細胞は、ヘルパーＴ細胞である。場合によっては、免疫細胞は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）である。

【０３５７】

場合によっては、細胞は、幹細胞である。幹細胞は、成体幹細胞を含む。成体幹細胞はまた、体性幹細胞とも称される。

【０３５８】

成体幹細胞は、分化組織に属するが、自己複製の特性、及び複数の細胞型、通常は幹細胞が見出される組織に典型的な細胞型を生じさせる能力を保持する。体性幹細胞の多くの例が当業者に既知であり、これには筋幹細胞、造血幹細胞、上皮幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、乳房幹細胞、腸幹細胞、中胚葉性幹細胞、内皮幹細胞、嗅覚幹細胞、神経堤

幹細胞等が含まれる。

【０３５９】

関心対象の幹細胞としては、哺乳類幹細胞が挙げられ、ここで、「哺乳類」という用語は、ヒト、非ヒト霊長類、飼育動物及び家畜、ならびに動物園、実験室、競技用、または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等を含む哺乳動物として分類される任意の動物を指す。場合によっては、幹細胞は、ヒト幹細胞である。場合によっては、幹細胞は、齧歯類（例えば、マウス、ラット）幹細胞である。場合によっては、幹細胞は、非ヒト霊長類幹細胞である。

【０３６０】

幹細胞は、１つ以上の幹細胞マーカー、例えば、ＳＯＸ９、ＫＲＴ１９、ＫＲＴ７、ＬＧＲ５、ＣＡ９、ＦＸＹＤ２、ＣＤＨ６、ＣＬＤＮ１８、ＴＳＰＡＮ８、ＢＰＩＦＢ１、ＯＬＦＭ４、ＣＤＨ１７、及びＰＰＡＲＧＣ１Ａを発現し得る。

【０３６１】

いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞（ＨＳＣ）である。ＨＳＣは、骨髄、血液、臍帯血、胎児肝臓、及び卵黄嚢から単離され得る中胚葉由来の細胞である。ＨＳＣは、$CD34^+$及び$CD3^-$として特徴付けられる。ＨＳＣは、赤血球、好中球－マクロファージ、巨核球、及びリンパ球造血細胞系統をインビボで再配置させ得る。インビトロでは、ＨＳＣは、少なくともいくつかの自己複製細胞分裂を経るように誘導され得、インビボで見られるものと同じ系統に分化するように誘導され得る。したがって、ＨＳＣは、赤血球細胞、巨核球、好中球、マクロファージ、及びリンパ球細胞のうちの１つ以上に分化するように誘導され得る。

【０３６２】

他の実施形態では、幹細胞は、神経幹細胞（ＮＳＣ）である。神経幹細胞（ＮＳＣ）は、ニューロン及びグリア（オリゴデンドロサイト及び星状細胞を含む）に分化することが可能である。神経幹細胞は、多分裂の能力を有する多能性幹細胞であり、特定の条件下で、神経幹細胞である娘細胞、または神経芽細胞もしくは神経膠芽細胞であり得る神経前駆細胞、例えば、それぞれ１種以上のニューロン及びグリア細胞になるように方向付けられた細胞を生み出し得る。ＮＳＣを得る方法は、当該技術分野で既知である。

【０３６３】

他の実施形態では、幹細胞は、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）である。本来、胚性中胚葉に由来し、成体骨髄から単離されたＭＳＣは、分化して、筋肉、骨、軟骨、脂肪、骨髄基質、及び腱を形成することができる。ＭＳＣを単離する方法は、当該技術分野で既知であり、任意の既知の方法を使用して、ＭＳＣを得ることができる。例えば、ヒトＭＳＣの単離について記載している米国特許第５，７３６，３９６号を参照されたい。

【０３６４】

細胞は、場合によっては、植物細胞である。植物細胞は、単子葉植物の細胞であり得る。細胞は、双子葉植物の細胞であり得る。

【０３６５】

場合によっては、細胞は、植物細胞である。例えば、細胞は、主要な農業植物、例えば、大麦、豆（乾燥食用）、キャノーラ、トウモロコシ、綿（ピマ）、綿（アプランド）、アマニ、乾草（アルファルファ）、乾草（非アルファルファ）、オーツ麦、ピーナッツ、米、モロコシ、大豆、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ（油）、ヒマワリ（非油）、サツマイモ、タバコ（バーレー）、タバコ（黄色種）、トマト、小麦（ダラム）、小麦（春）、小麦（冬）等の細胞であり得る。別の例として、細胞は、例えば、アルファルファスプラウト、アロエの葉、クズウコン、オモダカ、アーティチョーク、アスパラガス、筍、バナナの花、豆もやし、豆、ビーツの葉茎、ビーツ、ゴーヤ、チンゲンサイ、ブロッコリー、ブロッコリーレイブ（ラピーニ）、芽キャベツ、キャベツ、キャベツスプラウト、カクタスリーフ（ノパル）、カボチャ、カルドン、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハヤトウリ、チョロギ（クローヌ）、ハクサイ、キンサイ、ニラ、サイシン、シュンギク（ｔｕｎｇ　ｈｏ）、カラードグリーン、トウモロコシの茎、スイートコーン、キュウリ、ダイ

コン、食用タンポポの葉、タロイモ、豆苗（エンドウの葉）、トウキ（冬瓜）、ナス、エンダイブ、キクヂシャ、ゼンマイ、グンバイナズナ、フリゼ、カラシナ（チャイニーズマスタード）、カイラン、ガランガル（サイアム、タイ生ショウガ）、ニンニク、ショウガ、ゴボウ、グリーン、ハノーバーサラダグリーン、ウアウソントレ、エルサレムアーティチョーク、ヒカマ、ケールグリーン、コールラビ、アカザ（クェライト）、レタス（ビッブ）、レタス（ボストン）、レタス（ボストンレッド）、レタス（グリーンリーフ）、レタス（アイスバーグ）、レタス（サニーレタス）、レタス（オークリーフ・グリーン）、レタス（オークリーフ・レッド）、レタス（加工）、レタス（レッドリーフ）、レタス（ロメイン）、レタス（ルビーロメイン）、レタス（ロシアンレッドマスタード）、リンコック、ロボック、ササゲ、レンコン、マーシュ、マゲイ（アガベ）リーフ、ヤムイモ、メスクランミックス、水菜、モープ（ヘチマ）、モー、モクア（ファジースクワッシュ）、キノコ、マスタード、長芋、オクラ、空芯菜、ネギ、ウポ（ロングスクワッシュ）、装飾トウモロコシ、装飾ヒョウタン、パセリ、パースニップ、豆、トウガラシ（ベルタイプ）、トウガラシ、カボチャ、ラディッキオ、ラディッシュの芽、ラディッシュ、レイプグリーン、レイプグリーン、ルバーブ、ロメイン（ベビーレッド）、ルタバガ、アッケシソウ（シービーン）、ヘチマ（トカド／トカドヘチマ）、ホウレンソウ、スクワッシュ、ストローベイル、サトウキビ、サツマイモ、スイスチャード、タマリンド、タロ、タロの葉、タロの芽、ターサイ、テペグアヘ（ギンネム）、ティンドラ、トマティーヨ、トマト、トマト（チェリー）、トマト（グレープタイプ）、トマト（プラムタイプ）、ターメリック、カブの葉、カブ、ヒシの実、ヤンピ、ヤム、アブラナ、ユカ（キャッサバ）等を含むがこれらに限定されない、野菜作物の細胞である。

【０３６６】

細胞は、場合によっては、節足動物細胞である。例えば、細胞は、例えば、鋏角類、多足類、六脚類、蛛形綱、昆虫綱、イシノミ目、シミ目、旧翅下綱、カゲロウ目、トンボ目、不均翅亜目、均翅亜目、新翅類、外翅類、カワゲラ目、シロアリモドキ目、バッタ目、絶翅目、ハサミムシ目、網翅目、ガロアムシ目、コオロギモドキ科、マントファスマ科、ナナフシ目、ゴキブリ類、シロアリ目、カマキリ目、パラプネウロプテラ、チャタテムシ目、アザミウマ目、シラミ目、カメムシ目、内翅類もしくは完全変態類、ハチ目、コウチュウ目、ネジレバネ目、ラクダムシ目、広翅目、脈翅目、シリアゲムシ目、ノミ類、双翅目、毛翅目、または鱗翅目の亜目、科、亜科、群、下位群、または種の細胞であり得る。

【０３６７】

細胞は、場合によっては、昆虫細胞である。例えば、場合によっては、細胞は、蚊、バッタ、半翅類、ハエ、ノミ、ミツバチ、スズメバチ、アリ、シラミ、蛾、またはカブトムシの細胞である。

【０３６８】

標的細胞への構成要素の導入

Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（またはそれをコードするヌクレオチド配列を含む核酸）及び／またはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド（またはそれをコードするヌクレオチド配列を含む核酸）及び／またはドナーポリヌクレオチドは、様々な周知の方法のうちのいずれかによって宿主細胞に導入され得る。

【０３６９】

核酸を細胞に導入する方法は、当該技術分野で既知であり、任意の簡便な方法を使用して、核酸（例えば、発現構築物）を標的細胞（例えば、真核細胞、ヒト細胞、幹細胞、前駆細胞等）に導入することができる。好適な方法は、本明細書の他の箇所により詳細に記載されており、例えば、ウイルスまたはバクテリオファージ感染、形質移入、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）媒介型形質移入、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介型形質移入、リポソーム媒介型形質移入、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈降、直接マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介型核酸送達（例えば、Ｐａｎｙａｍ ｅｔ．，ａｌ Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．２０１２ Ｓｅｐ １３．ｐｉｉ：Ｓ０

１６９－４０９Ｘ（１２）００２８３－９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ａｄｄｒ．２０１２．０９．０２３を参照されたい）等が挙げられる。構成要素のうちのいずれかまたは全ては、例えばヌクレオフェクション等の既知の方法を使用して、組成物（例えば、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、ドナーポリヌクレオチド等の任意の簡便な組み合わせを含む）として細胞に導入することができる。

【０３７０】

ドナーポリヌクレオチド（ドナー鋳型）

Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡによって誘導されると、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、場合によっては、（例えば、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質がニッカーゼバリアントであるとき）二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）標的核酸内で部位特異的二本鎖切断（ＤＳＢ）または一本鎖切断（ＳＳＢ）を生じさせ、これらは非相同末端接合（ＮＨＥＪ）または相同性配向型組み換え（ＨＤＲ）のいずれかによって修復される。

【０３７１】

場合によっては、標的ＤＮＡを（Ｃａｓ１２Ｌタンパク質及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡと）接触させることは、非相同性末端接合または相同性配向型修復を許容する条件下で起こる。したがって、場合によっては、対象の方法は、標的ＤＮＡをドナーポリヌクレオチドと（例えば、ドナーポリヌクレオチドを細胞に導入することによって）接触させることを含み、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの部分、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部が標的ＤＮＡに組み込まれる。場合によっては、この方法は、細胞をドナーポリヌクレオチドと接触させることを含まず、標的ＤＮＡは、標的ＤＮＡ内のヌクレオチドが欠失するように改変される。

【０３７２】

場合によっては、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ（またはそれをコードする核酸）、及びＣａｓ１２Ｌタンパク質（またはそれをコードする核酸、例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ、例えば、１つ以上の発現ベクター）は、少なくとも標的ＤＮＡ配列に対して相同性を有するセグメントを含むドナーポリヌクレオチド配列と共投与され（例えば、標的核酸と接触させられる、細胞に投与される等）、対象の方法を使用して、核酸材料を標的ＤＮＡ配列に付加する、すなわち、挿入するまたは置き換える（例えば、核酸、例えば、タンパク質、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ等をコードするものに「ノックイン」すること）、タグ（例えば、６ｘＨｉｓ、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質等）、ヘマグルチニン（ＨＡ）、ＦＬＡＧ等）を付加する、調節配列を遺伝子に付加する（例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、配列内リボソーム進入配列（ＩＲＥＳ）、２Ａペプチド、開始コドン、終止コドン、スプライスシグナル、局在化シグナル等）、核酸配列を改変する（例えば、変異を導入する、正しい配列を導入することによって疾患を引き起こす変異を除去する）等してもよい。したがって、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ及びＣａｓ１２Ｌタンパク質を含む複合体は、例えば、遺伝子療法（例えば、疾患を治療するため）において、または抗ウイルス、抗病原性、もしくは抗がん治療薬、農業における遺伝子改変された生物の生成、治療、診断、もしくは研究目的での細胞によるタンパク質の大規模生成、ｉＰＳ細胞の誘導、生物学的研究、欠失もしくは置換のための病原体の遺伝子の標的化等として使用されるような、部位特異的、すなわち「標的化」方式でのＤＮＡの改変、例えば、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、遺伝子編集、遺伝子タグ付け等が望ましい、任意のインビトロまたはインビボ用途において有用である。

【０３７３】

ポリヌクレオチド配列を、標的配列が切断されるゲノムに挿入することが望ましい用途においては、ドナーポリヌクレオチド（ドナー配列を含む核酸）もまた細胞に提供され得る。「ドナー配列」または「ドナーポリヌクレオチド」または「ドナー鋳型」とは、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質によって切断された部位において（ｄｓＤＮＡ切断後、標的ＤＮＡをニッキングした後、標的ＤＮＡをダブルニッキングした後等に）挿入される核酸配列を意味する。ドナーポリヌクレオチドは、ドナーポリヌクレオチドと、それが相同性を有するゲノム配列との間の相同性配向型修復を支持するために、標的部位におけるゲノム配列に

対して十分な相同性、例えば、標的部位に隣接する、例えば、標的部位の約５０塩基以下内、例えば、約３０塩基内、約１５塩基内、約１０塩基内、約５塩基内、または標的部位に直ぐ隣接するヌクレオチド配列との７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の相同性を含有し得る。およそ２５、５０、１００、もしくは２００ヌクレオチド、または２００ヌクレオチド超の、ドナーとゲノム配列との間の配列相同性（または１０～２００ヌクレオチド、またはそれ超の間の任意の整数値）が、相同性配向型修復を支持し得る。ドナーポリヌクレオチドは、任意の長さ、例えば、１０ヌクレオチド以上、５０ヌクレオチド以上、１００ヌクレオチド以上、２５０ヌクレオチド以上、５００ヌクレオチド以上、１０００ヌクレオチド以上、５０００ヌクレオチド以上等であり得る。

【０３７４】

ドナー配列は、典型的には、それが置き換えるゲノム配列と同一ではない。むしろ、ドナー配列は、相同性配向型修復を支持するのに（例えば、遺伝子修正のため、例えば、疾患を引き起こす塩基対を、疾患を引き起こさない塩基対に変換するために）十分な相同性が存在する限り、ゲノム配列に対して少なくとも１つ以上の単一塩基変更、挿入、欠失、反転、または再構成を含有してもよい。いくつかの実施形態では、ドナー配列は、相同な２つの領域に隣接した非相同性配列を含み、それにより標的ＤＮＡ領域と、これら２つの隣接する配列との間の相同性配向型修復が、標的領域における非相同性配列の挿入をもたらす。ドナー配列はまた、関心対象のＤＮＡ領域に対して相同でなく、関心対象のＤＮＡ領域への挿入が意図されない配列を含有するベクター骨格も含み得る。一般に、ドナー配列の相同領域（複数可）は、組み換えが所望されるゲノム配列に対して少なくとも５０％の配列同一性を有するであろう。ある特定の実施形態では、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、または９９．９％の配列同一性が存在する。ドナーポリヌクレオチドの長さに応じて、１％～１００％の任意の値の配列同一性が存在し得る。

【０３７５】

ドナー配列は、ゲノム配列と比較して、ある特定の配列の差異、例えば、制限部位、ヌクレオチド多形、選択可能なマーカー（例えば、薬物耐性遺伝子、蛍光タンパク質、酵素等）を含んでもよく、これらは、切断部位におけるドナー配列の成功裏の挿入に関して評価するために使用されてもよいし、または場合によっては、他の目的で（例えば、標的とされたゲノム座位における発現を表すために）使用されてもよい。場合によっては、コード領域に位置する場合、そのようなヌクレオチド配列の差異は、アミノ酸配列を変化させないか、またはサイレントアミノ酸変化（すなわち、タンパク質の構造または機能に影響しない変化）をもたらす。代替として、これらの配列の差異は、マーカー配列の除去のために後の時点で活性化され得る、隣接する組み換え配列、例えば、ＦＬＰ、ｌｏｘＰ配列等を含み得る。

【０３７６】

場合によっては、ドナー配列は、一本鎖ＤＮＡとして細胞に提供される。場合によっては、ドナー配列は、二本鎖ＤＮＡとして細胞に提供される。これは、線状または環状形態で細胞に導入され得る。線状形態で導入される場合、ドナー配列の末端は、任意の簡便な方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護され得、そのような方法は、当業者に既知である。例えば、１つ以上のジデオキシヌクレオチド残基が、線状分子の３’末端に付加され得、及び／または自己相補的オリゴヌクレオチドが、一方の末端もしくは両方の末端にライゲーションされ得る。例えば、Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８４：４９５９－４９６３、Ｎｅｈｌｓ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７２：８８６－８８９を参照されたい。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するためのさらなる方法には、末端アミノ基（複数可）の付加、ならびに、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロアミダート、及びＯ－メチルリボースまたはデオキシリボース残基等の修飾ヌクレオチド間連結の使用が含まれるが、これらに限定されない。線状ドナー配列の末端を保護することに対する代替として、追加の長さの配列を相同な領域の外側に含めてもよく、これは組み換えに影響を及ぼすことなく分解され得る。ドナー配列は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生

物質耐性をコードする遺伝子等の追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞に導入され得る。さらに、ドナー配列は、裸の核酸として、リポソームもしくはポロキサマー等の薬剤と複合体化された核酸として導入され得るか、またはＣａｓ１２Ｌガイド ＲＮＡ及び／またはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド及び／またはドナーポリヌクレオチドをコードする核酸について本明細書の他の箇所に記載されるように、ウイルス（例えば、アデノウイルス、ＡＡＶ）によって送達され得る。

【０３７７】

検出方法

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、標的ＤＮＡ（二本鎖または一本鎖）の検出によって一度活性化されると、標的とされていない核酸（例えば、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）またはＲＮＡ）を無差別に切断することができる。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、ガイドＲＮＡによって一度活性化されると（これはガイドＲＮＡが標的ＤＮＡの標的配列とハイブリダイズするときに起こる）（すなわち、試料は、標的とされたＤＮＡを含む）、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、ｓｓＤＮＡを無差別に切断するヌクレアーゼになる（すなわち、ヌクレアーゼは、非標的ｓｓＤＮＡ、すなわち、ガイドＲＮＡのガイド配列がハイブリダイズしないｓｓＤＮＡを切断する）。場合によっては、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、ガイドＲＮＡによって一度活性化されると（これはガイドＲＮＡが標的ＤＮＡの標的配列とハイブリダイズするときに起こる）（すなわち、試料は、標的とされたＤＮＡを含む）、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、ＲＮＡを無差別に切断するヌクレアーゼになる（すなわち、ヌクレアーゼは、非標的ＲＮＡ、すなわち、ガイドＲＮＡのガイド配列がハイブリダイズしないＲＮＡを切断する）。したがって、標的ＤＮＡが試料中に存在するとき（例えば、場合によっては、閾値量を上回る）、結果は試料中のｓｓＤＮＡまたはＲＮＡの切断であり、これは任意の簡便な検出方法を使用して（例えば、標識された一本鎖検出器ＤＮＡまたは検出器ＲＮＡを使用して）検出することができる。

【０３７８】

標的ＤＮＡを検出するための組成物及び方法

試料中の標的ＤＮＡ（二本鎖または一本鎖）を検出するための組成物及び方法が提供される。場合によっては、一本鎖（ｓｓＤＮＡ）であり、かつガイドＲＮＡのガイド配列とハイブリダイズしない検出器ＤＮＡが使用される（すなわち、検出器ｓｓＤＮＡは、非標的ｓｓＤＮＡである）。そのような方法は、（ａ）試料を、（ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、（ｉｉ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合する領域、及び標的ＤＮＡとハイブリダイズするガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、ならびに（ｉｉｉ）一本鎖であり、かつガイドＲＮＡのガイド配列とハイブリダイズしない検出器ＤＮＡと接触させることと、（ｂ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドによる一本鎖検出器ＤＮＡの切断によって生成される検出可能なシグナルを測定することにより、標的ＤＮＡを検出することとを含み得る。上述したように、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、ガイドＲＮＡによって一度活性化されると（これは試料が、ガイドＲＮＡがハイブリダイズする標的ＤＮＡを含むときに起こる）（すなわち、試料は、標的とされた標的ＤＮＡを含む）、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは活性化され、試料中に存在するｓｓＤＮＡ（非標的ｓｓＤＮＡを含む）を非特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼとして機能する。したがって、標的とされた標的ＤＮＡが試料中に存在するとき（例えば、場合によっては、閾値量を上回る）、結果は試料中のｓｓＤＮＡ（非標的ｓｓＤＮＡを含む）の切断であり、これは任意の簡便な方法を使用して（例えば、標識された検出器ｓｓＤＮＡを使用して）検出することができる。

【０３７９】

また、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）（例えば、非標的ｓｓＤＮＡ）を切断するための組成物及び方法も提供される。そのような方法は、核酸の集団を（該集団は、標的ＤＮＡ及び複数の非標的ｓｓＤＮＡを含む）、（ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、ならびに（ｉｉ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合する領域、及び標的ＤＮＡとハイブリダイズするガイド配列を含む、ガイドＲＮＡと接触させることを含み得、Ｃａｓ１２Ｌポリペプ

チドが、該複数の非標的ｓｓＤＮＡを切断する。そのような方法を使用して、例えば、細胞中の外来ｓｓＤＮＡ（例えば、ウイルスＤＮＡ）を切断することができる。

【０３８０】

対象の方法の接触ステップは、二価金属イオンを含む組成物中で実行することができる。接触ステップは、無細胞環境、例えば、細胞の外部で実行することができる。接触ステップは、細胞の内部で実行することができる。接触ステップは、インビトロの細胞で実行することができる。接触ステップは、エクスビボの細胞で実行することができる。接触ステップは、インビボの細胞で実行することができる。

【０３８１】

ガイドＲＮＡは、ＲＮＡとして、またはガイドＲＮＡをコードする核酸（例えば、組み換え発現ベクター等のＤＮＡ）として提供され得る。Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドは、タンパク質として、またはタンパク質をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ、組み換え発現ベクター等のＤＮＡ）として提供され得る。場合によっては、２つ以上（例えば、３つ以上、４つ以上、５つ以上、または６つ以上）のガイドＲＮＡが、（例えば、Ｃａｓ１２Ｌエフェクタータンパク質によって個々の（「成熟」）ガイドＲＮＡに切断され得る前駆体ガイドＲＮＡアレイを使用して）提供され得る。

【０３８２】

場合によっては（例えば、ガイドＲＮＡ及び本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと接触させるとき）、試料は、測定ステップの前に２時間以下（例えば、１．５時間以下、１時間以下、４０分間以下、３０分間以下、２０分間以下、１０分間以下、または５分間以下、または１分間以下）接触させられる。例えば、場合によっては、試料は、測定ステップの前に４０分間以下接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に２０分間以下接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に１０分間以下接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に５分間以下接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に１分間以下接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に５０秒間～６０秒間接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に４０秒間～５０秒間接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に３０秒間～４０秒間接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に２０秒間～３０秒間接触させられる。場合によっては、試料は、測定ステップの前に１０秒間～２０秒間接触させられる。

【０３８３】

試料中の標的ＤＮＡ（一本鎖または二本鎖）を検出するための本開示の方法は、高感度で標的ＤＮＡを検出することができる。場合によっては、本開示の方法を使用して、複数のＤＮＡ（標的ＤＮＡ及び複数の非標的ＤＮＡを含む）を含む試料中に存在する標的ＤＮＡを検出することができ、ここで、標的ＤＮＡは、10^{7}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上（例えば、10^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{4}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{2}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、５０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、２０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、または５個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上）で存在する。場合によっては、本開示の方法を使用して、複数のＤＮＡ（標的ＤＮＡ及び複数の非標的ＤＮＡを含む）を含む試料中に存在する標的ＤＮＡを検出することができ、ここで、標的ＤＮＡは、10^{18}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上（例えば、10^{15}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{12}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{9}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{4}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、10^{2}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、５０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、２０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上、または５個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー以上）で存在する。

【０３８４】
場合によっては、本開示の方法は、試料中に存在する標的ＤＮＡを検出することができ、ここで、標的ＤＮＡは、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー（例えば、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^3個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^4個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^3個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^4個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^3個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、または10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^4個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー）で存在する。

【０３８５】
場合によっては、本開示の方法は、試料中に存在する標的ＤＮＡを検出することができ、ここで、標的ＤＮＡは、10^{18}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー（例えば、10^{18}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^{15}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^{12}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^9個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^3個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^4個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^3個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^4個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^3個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、または10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^4個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー）で存在する。

【０３８６】
場合によっては、本開示の方法は、試料中に存在する標的ＤＮＡを検出することができ、ここで、標的ＤＮＡは、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー（例えば、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^3個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^4個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^5個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^7個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、10^6個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから10^2個の非標的ＤＮＡ

当たり１コピー、１０^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{4}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{2}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、または１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{4}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー）で存在する。

【０３８７】

場合によっては、試料中の標的ＤＮＡを検出するための対象の方法に関して、検出閾値は１０ｎＭ以下である。「検出閾値」という用語は、検出が起こるために試料中に存在しなければならない標的ＤＮＡの最小量を説明するために本明細書において使用される。したがって、例示的な例として、検出閾値が１０ｎＭである場合、標的ＤＮＡが１０ｎＭ以上の濃度で試料中に存在する場合にシグナルが検出され得る。場合によっては、本開示の方法は、５ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．５ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．１ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．０５ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．０１ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．００５ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．００１ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．０００５ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．０００１ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．００００５ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、０．００００１ｎＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１０ｐＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１ｐＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、５００ｆＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、２５０ｆＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１００ｆＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、５０ｆＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、５００ａＭ（アトモル）以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、２５０ａＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１００ａＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、５０ａＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１０ａＭ以下の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１ａＭ以下の検出閾値を有する。

【０３８８】

場合によっては、（対象の方法において標的ＤＮＡを検出するための）検出閾値は、５００ｆＭ～１ｎＭ（例えば、５００ｆＭ～５００ｐＭ、５００ｆＭ～２００ｐＭ、５００ｆＭ～１００ｐＭ、５００ｆＭ～１０ｐＭ、５００ｆＭ～１ｐＭ、８００ｆＭ～１ｎＭ、８００ｆＭ～５００ｐＭ、８００ｆＭ～２００ｐＭ、８００ｆＭ～１００ｐＭ、８００ｆＭ～１０ｐＭ、８００ｆＭ～１ｐＭ、１ｐＭ～１ｎＭ、１ｐＭ～５００ｐＭ、１ｐＭ～２００ｐＭ、１ｐＭ～１００ｐＭ、１ｐＭ～１０ｐＭ）の範囲である（ここで、濃度は、標的ＤＮＡが検出され得る、標的ＤＮＡの閾値濃度を指す）。場合によっては、本開示の方法は、８００ｆＭ～１００ｐＭの範囲の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１ｐＭ～１０ｐＭの範囲の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、１０ｆＭ～５００ｆＭ、例えば、１０ｆＭ～５０ｆＭ、５０ｆＭ～１００ｆＭ、１００ｆＭ～２５０ｆＭ、または２５０ｆＭ～５００ｆＭの範囲の検出閾値を有する。

【０３８９】

場合によっては、試料中で標的ＤＮＡが検出され得る最小濃度は、５００ｆＭ～１ｎＭ（例えば、５００ｆＭ～５００ｐＭ、５００ｆＭ～２００ｐＭ、５００ｆＭ～１００ｐＭ、５００ｆＭ～１０ｐＭ、５００ｆＭ～１ｐＭ、８００ｆＭ～１ｎＭ、８００ｆＭ～５０

０ｐＭ、８００ｆＭ～２００ｐＭ、８００ｆＭ～１００ｐＭ、８００ｆＭ～１０ｐＭ、８００ｆＭ～１ｐＭ、１ｐＭ～１ｎＭ、１ｐＭ～５００ｐＭ、１ｐＭ～２００ｐＭ、１ｐＭ～１００ｐＭ、１ｐＭ～１０ｐＭ）の範囲である。場合によっては、試料中で標的ＤＮＡが検出され得る最小濃度は、８００ｆＭ～１００ｐＭの範囲である。場合によっては、試料中で標的ＤＮＡが検出され得る最小濃度は、１ｐＭ～１０ｐＭの範囲である。

【０３９０】

場合によっては、（対象の方法において標的ＤＮＡを検出するための）検出閾値は、１ａＭ～１ｎＭ（例えば、１ａＭ～５００ｐＭ、１ａＭ～２００ｐＭ、１ａＭ～１００ｐＭ、１ａＭ～１０ｐＭ、１ａＭ～１ｐＭ、１００ａＭ～１ｎＭ、１００ａＭ～５００ｐＭ、１００ａＭ～２００ｐＭ、１００ａＭ～１００ｐＭ、１００ａＭ～１０ｐＭ、１００ａＭ～１ｐＭ、２５０ａＭ～１ｎＭ、２５０ａＭ～５００ｐＭ、２５０ａＭ～２００ｐＭ、２５０ａＭ～１００ｐＭ、２５０ａＭ～１０ｐＭ、２５０ａＭ～１ｐＭ、５００ａＭ～１ｎＭ、５００ａＭ～５００ｐＭ、５００ａＭ～２００ｐＭ、５００ａＭ～１００ｐＭ、５００ａＭ～１０ｐＭ、５００ａＭ～１ｐＭ、７５０ａＭ～１ｎＭ、７５０ａＭ～５００ｐＭ、７５０ａＭ～２００ｐＭ、７５０ａＭ～１００ｐＭ、７５０ａＭ～１０ｐＭ、７５０ａＭ～１ｐＭ、１ｆＭ～１ｎＭ、１ｆＭ～５００ｐＭ、１ｆＭ～２００ｐＭ、１ｆＭ～１００ｐＭ、１ｆＭ～１０ｐＭ、１ｆＭ～１ｐＭ、５００ｆＭ～５００ｐＭ、５００ｆＭ～２００ｐＭ、５００ｆＭ～１００ｐＭ、５００ｆＭ～１０ｐＭ、５００ｆＭ～１ｐＭ、８００ｆＭ～１ｎＭ、８００ｆＭ～５００ｐＭ、８００ｆＭ～２００ｐＭ、８００ｆＭ～１００ｐＭ、８００ｆＭ～１０ｐＭ、８００ｆＭ～１ｐＭ、１ｐＭ～１ｎＭ、１ｐＭ～５００ｐＭ、１ｐＭ～２００ｐＭ、１ｐＭ～１００ｐＭ、１ｐＭ～１０ｐＭ）の範囲である（濃度は、標的ＤＮＡが検出され得る、標的ＤＮＡの閾値濃度を指す）。場合によっては、本開示の方法は、１ａＭ～８００ａＭの範囲の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、５０ａＭ～１ｐＭの範囲の検出閾値を有する。場合によっては、本開示の方法は、５０ａＭ～５００ｆＭの範囲の検出閾値を有する。

【０３９１】

場合によっては、試料中で標的ＤＮＡが検出され得る最小濃度は、１ａＭ～１ｎＭ（例えば、１ａＭ～５００ｐＭ、１ａＭ～２００ｐＭ、１ａＭ～１００ｐＭ、１ａＭ～１０ｐＭ、１ａＭ～１ｐＭ、１００ａＭ～１ｎＭ、１００ａＭ～５００ｐＭ、１００ａＭ～２００ｐＭ、１００ａＭ～１００ｐＭ、１００ａＭ～１０ｐＭ、１００ａＭ～１ｐＭ、２５０ａＭ～１ｎＭ、２５０ａＭ～５００ｐＭ、２５０ａＭ～２００ｐＭ、２５０ａＭ～１００ｐＭ、２５０ａＭ～１０ｐＭ、２５０ａＭ～１ｐＭ、５００ａＭ～１ｎＭ、５００ａＭ～５００ｐＭ、５００ａＭ～２００ｐＭ、５００ａＭ～１００ｐＭ、５００ａＭ～１０ｐＭ、５００ａＭ～１ｐＭ、７５０ａＭ～１ｎＭ、７５０ａＭ～５００ｐＭ、７５０ａＭ～２００ｐＭ、７５０ａＭ～１００ｐＭ、７５０ａＭ～１０ｐＭ、７５０ａＭ～１ｐＭ、１ｆＭ～１ｎＭ、１ｆＭ～５００ｐＭ、１ｆＭ～２００ｐＭ、１ｆＭ～１００ｐＭ、１ｆＭ～１０ｐＭ、１ｆＭ～１ｐＭ、５００ｆＭ～５００ｐＭ、５００ｆＭ～２００ｐＭ、５００ｆＭ～１００ｐＭ、５００ｆＭ～１０ｐＭ、５００ｆＭ～１ｐＭ、８００ｆＭ～１ｎＭ、８００ｆＭ～５００ｐＭ、８００ｆＭ～２００ｐＭ、８００ｆＭ～１００ｐＭ、８００ｆＭ～１０ｐＭ、８００ｆＭ～１ｐＭ、１ｐＭ～１ｎＭ、１ｐＭ～５００ｐＭ、１ｐＭ～２００ｐＭ、１ｐＭ～１００ｐＭ、１ｐＭ～１０ｐＭ）の範囲である。場合によっては、試料中で標的ＤＮＡが検出され得る最小濃度は、１ａＭ～５００ｐＭの範囲である。場合によっては、試料中で標的ＤＮＡが検出され得る最小濃度は、１００ａＭ～５００ｐＭの範囲である。

【０３９２】

場合によっては、対象の組成物または方法は、アトモル（ａＭ）の検出感度を示す。場合によっては、対象の組成物または方法は、フェムトモル（ｆＭ）の検出感度を示す。場合によっては、対象の組成物または方法は、ピコモル（ｐＭ）の検出感度を示す。場合によっては、対象の組成物または方法は、ナノモル（ｎＭ）の検出感度を示す。

【０３９３】

標的ＤＮＡ

標的ＤＮＡは、一本鎖（ｓｓＤＮＡ）または二本鎖（ｄｓＤＮＡ）であり得る。標的ＤＮＡが一本鎖である場合、標的ＤＮＡにおいてＰＡＭ配列に対する選好または要件は存在しない。しかしながら、標的ＤＮＡがｄｓＤＮＡである場合、ＰＡＭは通常、標的ＤＮＡの標的配列に隣接して存在する（例えば、本明細書の他の箇所のＰＡＭの考察を参照されたい）。標的ＤＮＡの供給源は、例えば、下記に記載されるような、試料の供給源と同一であり得る。

【０３９４】

標的ＤＮＡの供給源は、任意の供給源であり得る。場合によっては、標的ＤＮＡは、ウイルスＤＮＡ（例えば、ＤＮＡウイルスのゲノムＤＮＡ）である。したがって、対象の方法は、（例えば、試料中の）核酸の集団の中のウイルスＤＮＡの存在を検出するためのものであり得る。また、対象の方法は、標的ＤＮＡの存在下で非標的ｓｓＤＮＡの切断に使用することもできる。例えば、方法が細胞中で起こる場合、対象の方法は、特定の標的ＤＮＡが細胞中に存在する場合（例えば、細胞がウイルスに感染し、ウイルス標的ＤＮＡが検出される場合）、細胞中の非標的ｓｓＤＮＡ（ガイドＲＮＡのガイド配列とハイブリダイズしないｓｓＤＮＡ）を無差別に切断するために使用することができる。

【０３９５】

可能性のある標的ＤＮＡの例としては、例えば、パポバウイルス（例えば、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ポリオーマウイルス）、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ））、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスリンパ球向性ウイルス、バラ色粃糠疹、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス）、アデノウイルス（例えば、アタデノウイルス、アビアデノウイルス、イクタデノウイルス、マストアデノウイルス、シアデノウイルス）、ポックスウイルス（例えば、天然痘、ワクシニアウイルス、牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、オルフウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウイルス、タナ痘ウイルス、ヤバサル腫瘍ウイルス、伝染性軟属腫ウイルス（ＭＣＶ））、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、パルボウイルスＢ１９、ヒトボカウイルス、ブファウイルス、ヒトｐａｒｖ４　Ｇ１）、ジェミニウイルス科、ナノウイルス科、フィコドナウイルス科等のウイルスＤＮＡが挙げられるが、これらに限定されない。場合によっては、標的ＤＮＡは、寄生虫ＤＮＡである。場合によっては、標的ＤＮＡは、細菌ＤＮＡ、例えば、病原性細菌のＤＮＡである。

【０３９６】

試料

対象試料は、核酸（例えば、複数の核酸）を含む。「複数」という用語は、本明細書において、２つ以上を意味するように使用される。したがって、場合によっては、試料は、２個以上（例えば、３個以上、５個以上、１０個以上、２０個以上、５０個以上、１００個以上、５００個以上、１，０００個以上、または５，０００個以上）の核酸（例えば、ＤＮＡ）を含む。対象の方法は、試料中（例えば、ＤＮＡ等の核酸の複合混合物中）に存在する標的ＤＮＡを検出するための非常に高感度の方式として使用することができる。場合によっては、試料は、配列が互いに異なる５個以上のＤＮＡ（例えば、１０個以上、２０個以上、５０個以上、１００個以上、５００個以上、１，０００個以上、または５，０００個以上のＤＮＡ）を含む。場合によっては、試料は、１０個以上、２０個以上、５０個以上、１００個以上、５００個以上、10^3個以上、5×10^3個以上、10^4個以上、5×10^4個以上、10^5個以上、5×10^5個以上、10^6個以上、5×10^6個以上、または10^7個以上のＤＮＡを含む。場合によっては、試料は、１０～２０個、２０～５０個、５０～１００個、１００～５００個、５００～10^3個、10^3～5×10^3個、5×10^3～10^4個、10^4～5×10^4個、5×10^4～10^5個、10^5～5×10^5個、5×10^5～10^6個、10^6～5×10^6個、または5×10^6～10^7個、または10^7個超のＤＮＡを含む。場合によっては、試料は、５～10^7個のＤＮＡ

（例えば、配列が互いに異なる）（例えば、５～１０^{6}個、５～１０^{5}個、５～５０，０００個、５～３０，０００個、１０～１０^{6}個、１０～１０^{5}個、１０～５０，０００個、１０～３０，０００個、２０～１０^{6}個、２０～１０^{5}個、２０～５０，０００個、または２０～３０，０００個のＤＮＡ）を含む。場合によっては、試料は、配列が互いに異なる２０個以上のＤＮＡを含む。場合によっては、試料は、細胞溶解物（例えば、真核細胞溶解物、哺乳類細胞溶解物、ヒト細胞溶解物、原核細胞溶解物、植物細胞溶解物等）由来のＤＮＡを含む。例えば、場合によっては、試料は、真核細胞、例えば、ヒト細胞等の哺乳類細胞等の細胞由来のＤＮＡを含む。

【０３９７】

「試料」という用語は、本明細書では、ＤＮＡを含む任意の試料を意味するように使用される（例えば、標的ＤＮＡがＤＮＡの集団の中に存在するかどうかを決定するため）。試料は、任意の供給源に由来し得、例えば、試料は、精製されたＤＮＡの合成的な組み合わせであり得、試料は、細胞溶解物、ＤＮＡ富化細胞溶解物、または細胞溶解物から単離された及び／または精製されたＤＮＡであり得る。試料は、（例えば、診断の目的において）患者由来であり得る。試料は、透過処理された細胞由来であり得る。試料は、架橋された細胞由来であり得る。試料は、組織切片の形態であり得る。試料は、架橋、続いて脱脂、及び均一な屈折率をもたらすための調整によって調製された組織由来であり得る。架橋、続いて脱脂、及び均一な屈折率をもたらすための調整による組織調製の例は、例えば、Ｓｈａｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ（２０１６）１４３，２８６２－２８６７　ｄｏｉ：１０．１２４２／ｄｅｖ．１３８５６０に記載されている。

【０３９８】

「試料」は、標的ＤＮＡ及び複数の非標的ＤＮＡを含み得る。場合によっては、標的ＤＮＡは、１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、２０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、２５個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、５０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、５００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、５×１０^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{4}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、５×１０^{4}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、５×１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、または１０^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー未満で試料中に存在する。場合によっては、標的ＤＮＡは、１０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから２０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、２０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから５０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、５０個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから５００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、５００個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから５×１０^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、５×１０^{3}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{4}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{4}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、１０^{5}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピー、または１０^{6}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーから１０^{7}個の非標的ＤＮＡ当たり１コピーで試料中に存在する。

【０３９９】

好適な試料としては、唾液、血液、血清、血漿、尿、吸引液、及び生検試料が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、患者に関する「試料」という用語は、生物学的起源の血液及び他の液体試料、固体組織試料、例えば、生検検体もしくは組織培養物またはそれに由来する細胞及びその子孫を包含する。この定義はまた、調達後に任意の方式で、例えば、試薬での処理、洗浄、またはがん細胞等のある特定の細胞集団の濃縮等によって操作された試料も含む。この定義はまた、特定の種類の分子、例えば、ＤＮＡが濃縮された試料も含む。「試料」という用語は、例えば、血液、血漿、血清、吸引液、脳脊髄液（ＣＳＦ）等の臨床試料等の生体試料を包含し、また、外科的切除によって得られた組織、生検によって得られた組織、培養中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、組織試料、器官

、骨髄等も含む。「生体試料」は、それ（例えば、がん細胞、感染細胞等）に由来する生体液、例えば、そのような細胞から得られるＤＮＡを含む試料（例えば、細胞溶解物、またはＤＮＡを含む他の細胞抽出物）を含む。

【０４００】

試料は、任意の様々な細胞、組織、器官、または無細胞流体を含み得るか、またはそれらから得ることができる。好適な試料の供給源としては、真核細胞、細菌細胞、及び古細菌細胞が挙げられる。好適な試料の供給源としては、単細胞生物及び多細胞生物が挙げられる。好適な試料の供給源としては、単細胞真核生物；植物または植物細胞；藻類細胞、例えば、ボツリオコッカス・ブラウニー、コナミドリムシ、ナンノクロロプシス・ガディタナ、クロレラ・ピレノイドサ、サルガッスム・パテンス、Ｃ．アガード等；真菌細胞（例えば、酵母細胞）；動物細胞、組織、または器官；無脊椎動物（例えば、ショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線形動物、昆虫、クモ類等）由来の細胞、組織、または器官；脊椎動物（例えば、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物）由来の細胞、組織、流体、または器官；哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、有蹄類、ネコ、ウシ、ヒツジ、ヤギ等）由来の細胞、組織、流体、または器官が挙げられる。好適な試料の供給源としては、線形動物、原生動物等が挙げられる。好適な試料の供給源としては、例えば、蠕虫類、マラリア原虫等の寄生虫が挙げられる。

【０４０１】

好適な試料の供給源としては、６界、例えば、細菌（例えば、真正細菌）界、古細菌界、原生生物界、菌界、植物界、及び動物界のうちのいずれかの細胞、組織、または生物が挙げられる。好適な試料の供給源としては、藻類（例えば、緑藻、紅藻、灰色藻、シアノバクテリア）を含むがこれらに限定されない原生生物界の植物様メンバー；原生生物界の菌様メンバー、例えば、粘菌類、水生菌類等；原生生物界の動物様メンバー、例えば、鞭毛虫類（例えば、ユーグレナ（Ｅｕｇｌｅｎａ））、アメーバ様（例えば、アメーバ）、胞子虫類（例えば、アピコンプレックス門（Ａｐｉｃｏｍｐｌｅｘａ）、ミクソゾア門（Ｍｙｘｏｚｏａ）、微胞子虫類（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｉｄｉａ））、及び繊毛虫類（例えば、ゾウリムシ（Ｐａｒａｍｅｃｉｕｍ））が挙げられる。好適な試料の供給源としては、以下の門：担子菌門（Ｂａｓｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ）（棍棒状菌、例えば、ハラタケ属（Ａｇａｒｉｃｕｓ）、テングタケ属（Ａｍａｎｉｔａ）、ヤマドリタケ属（Ｂｏｌｅｔｕｓ）、カンテレルス（Ｃａｎｔｈｅｒｅｌｌｕｓ）等のメンバー）、子嚢菌門（Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ）（例えば、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）を含む子嚢菌）、ミコフィコフィタ（Ｍｙｃｏｐｈｙｃｏｐｈｙｔａ）（地衣類）、接合菌門（Ｚｙｇｏｍｙｃｏｔａ）（抱合菌）、及び不完全菌門（Ｄｅｕｔｅｒｏｍｙｃｏｔａ）のうちのいずれかのメンバーを含むが、これらに限定されない、菌界のメンバーが挙げられる。好適な試料の供給源としては、以下の門：コケ植物門（Ｂｒｙｏｐｈｙｔａ）（例えば、蘚類）、ツノゴケ植物門（Ａｎｔｈｏｃｅｒｏｔｏｐｈｙｔａ）（例えば、ツノゴケ類）、ヘパティコフィタ（Ｈｅｐａｔｉｃｏｐｈｙｔａ）（例えば、苔類）、リコフィタ（Ｌｙｃｏｐｈｙｔａ）（例えば、ヒカゲノカズラ類）、有節植物門（Ｓｐｈｅｎｏｐｈｙｔａ）（例えば、ツクシ）、裸茎植物門（Ｐｓｉｌｏｐｈｙｔａ）（例えば、マツバラン）、オフィオグロソフィタ（Ｏｐｈｉｏｇｌｏｓｓｏｐｈｙｔａ）、プテロフィタ（Ｐｔｅｒｏｐｈｙｔａ）（例えば、シダ類）、ソテツ門（Ｃｙｃａｄｏｐｈｙｔａ）、ギンコフィタ（Ｇｉｎｇｋｏｐｈｙｔａ）、マツ植物門（Ｐｉｎｏｐｈｙｔａ）、マオウ門（Ｇｎｅｔｏｐｈｙｔａ）、及びモクレン植物門（Ｍａｇｎｏｌｉｏｐｈｙｔａ）（例えば、顕花植物）のうちのいずれかのメンバーを含むが、これらに限定されない、植物界のメンバーが挙げられる。好適な試料の供給源としては、以下の門：カイメン動物門（Ｐｏｒｉｆｅｒａ）（海綿類）、平板動物門（Ｐｌａｃｏｚｏａ）、直泳動物門（Ｏｒｔｈｏｎｅｃｔｉｄａ）（海洋無脊椎動物の寄生虫）、ロンボゾア（Ｒｈｏｍｂｏｚｏａ）、刺胞動物門（Ｃｎｉｄａｒｉａ）（サンゴ、イソギンチャク、クラゲ、ウミエラ、ウミシイタケ（ｓｅａ　ｐａｎｓｉｅｓ）、キロネックス）、有　動物門（Ｃｔｅｎｏｐｈｏｒａ）（クシクラゲ類）、扁形動物門（Ｐｌａｔｙｈｅｌｍｉｎｔｈｅｓ）（扁形動物）、紐形動

物門（Ｎｅｍｅｒｔｉｎａ）（ひも形動物）、顎口動物門（Ｎｇａｔｈｏｓｔｏｍｕｌｉｄａ）（顎口動物）、腹毛動物門（Ｇａｓｔｒｏｔｒｉｃｈａ）、輪形動物門（Ｒｏｔｉｆｅｒａ）、鰓曳動物門（Ｐｒｉａｐｕｌｉｄａ）、動吻動物門（Ｋｉｎｏｒｈｙｎｃｈａ）、胴甲動物門（Ｌｏｒｉｃｉｆｅｒａ）、鉤頭虫門（Ａｃａｎｔｈｏｃｅｐｈａｌａ）、内肛動物門（Ｅｎｔｏｐｒｏｃｔａ）、線形動物門（Ｎｅｍｏｔｏｄａ）、類線形動物門（Ｎｅｍａｔｏｍｏｒｐｈａ）、有輪動物門（Ｃｙｃｌｉｏｐｈｏｒａ）、軟体動物門（Ｍｏｌｌｕｓｃａ）（軟体動物）、星口動物門（Ｓｉｐｕｎｃｕｌａ）（星口動物）、環形動物門（Ａｎｎｅｌｉｄａ）（環形動物）、緩歩動物門（Ｔａｒｄｉｇｒａｄａ）（緩歩動物）、有爪動物門（Ｏｎｙｃｈｏｐｈｏｒａ）（有爪動物）、節足動物門（Ａｒｔｈｒｏｐｏｄａ）（鋏角亜門（Ｃｈｅｌｉｃｅｒａｔａ）、多足亜門（Ｍｙｒｉａｐｏｄａ）、六脚亜門（Ｈｅｘａｐｏｄａ）、及び甲殻亜門（Ｃｒｕｓｔａｃｅａ）の亜門を含み、鋏角亜門は、例えば、クモ類、メロストマ類（Ｍｅｒｏｓｔｏｍａｔａ）、及びウミグモ類（Ｐｙｃｎｏｇｏｎｉｄａ）を含み、多足亜門は、例えば、唇脚類（Ｃｈｉｌｏｐｏｄａ）（ムカデ）、倍脚類（Ｄｉｐｌｏｐｏｄａ）（ヤスデ）、パロポーダ（Ｐａｒｏｐｏｄａ）、及び結合類（Ｓｙｍｐｈｙｌａ）を含み、六脚亜門は昆虫を含み、甲殻亜門は、エビ、オキアミ、フジツボ等を含む）、箒虫類（Ｐｈｏｒｏｎｉｄａ）、外肛類（Ｅｃｔｏｐｒｏｃｔａ）（コケムシ）、腕足類（Ｂｒａｃｈｉｏｐｏｄａ）、棘皮動物（Ｅｃｈｉｎｏｄｅｒｍａｔａ）（例えば、ヒトデ、シャリンヒトデ、ウミシダ、ウニ、ナマコ、クモヒトデ、ブリットルバスケット等）、毛顎動物（Ｃｈａｅｔｏｇｎａｔｈａ）（顎動物）、半索動物（Ｈｅｍｉｃｈｏｒｄａｔａ）（腸鰓類）、及び脊索動物（Ｃｈｏｒｄａｔａ）のうちのいずれかのメンバーを含むが、これらに限定されない動物界のメンバーが挙げられる。脊索動物の好適なメンバーとしては、以下の亜門：尾索動物亜門（Ｕｒｏｃｈｏｒｄａｔａ）（ホヤ；海鞘類（Ａｓｃｉｄｉａｃｅａ）、サルパ類（Ｔｈａｌｉａｃｅａ）、及び幼形類（Ｌａｒｖａｃｅａ）を含む）、頭索動物亜門（Ｃｅｐｈａｌｏｃｈｏｒｄａｔａ）（ナメクジウオ）、ミクシニ（Ｍｙｘｉｎｉ）（ヌタウナギ）、及び脊椎動物亜門（Ｖｅｒｔｅｂｒａｔａ）のうちのいずれかのメンバーが挙げられ、脊椎動物亜門のメンバーとしては、例えばペトロミゾンチダ（Ｐｅｔｒｏｍｙｚｏｎｔｉｄａ）（ヤツメウナギ）、コンドリキティセス（Ｃｈｏｎｄｒｉｃｈｔｈｙｃｅｓ）（軟骨魚類）、条鰭亜綱（Ａｃｔｉｎｏｐｔｅｒｙｇｉｉ）（硬骨魚類）、アクチニスタ（Ａｃｔｉｎｉｓｔａ）（シーラカンス）、肺魚亜綱（Ｄｉｐｎｏｉ）（肺魚類）、爬虫類（Ｒｅｐｔｉｌｉａ）（爬虫類（ｒｅｐｔｉｌｅ）、例えば、ヘビ、ワニ、ワニ、トカゲ等）、鳥類（Ａｖｅｓ）（鳥類（ｂｉｒｄ））、及び哺乳類（Ｍａｍｍａｌｉａｎ）（哺乳動物）のメンバーが挙げられる。好適な植物としては、任意の単子葉植物及び任意の双子葉植物が挙げられる。

【０４０２】

好適な試料の供給源としては、生物から採取した細胞、流体、組織、もしくは器官、生物から単離された特定の細胞もしくは細胞の集団等が挙げられる。例えば、生物が植物である場合、好適な供給源としては、木部、師部、形成層、葉、根等が挙げられる。生物が動物である場合、好適な供給源としては、特定の組織（例えば、肺、肝臓、心臓、腎臓、脳、脾臓、皮膚、胎児組織等）、または特定の細胞型（例えば、ニューロン細胞、上皮細胞、内皮細胞、星状細胞、マクロファージ、グリア細胞、膵島細胞、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球等）が挙げられる。

【０４０３】

場合によっては、試料の供給源は、罹患した（または罹患した疑いがある）細胞、流体、組織、または器官である。場合によっては、試料の供給源は、正常な（罹患していない）細胞、流体、組織、または器官である。場合によっては、試料の供給源は、病原体に感染した（または感染した疑いがある）細胞、組織、または器官である。例えば、試料の供給源は、感染している場合もあれば、感染していない場合もある個体であり得、試料は、その個体から収集された任意の生体試料（例えば、血液、唾液、生検、血漿、血清、気管支肺胞洗浄液、痰、糞便試料、脳脊髄液、微細針吸引液、スワブ試料（例えば、頬スワブ

、子宮頸部スワブ、鼻腔スワブ）、間質液、滑液、鼻汁、涙液、軟膜、粘膜試料、上皮細胞試料（例えば、上皮細胞擦過物）等）であり得る。場合によっては、試料は、無細胞液体試料である。場合によっては、試料は、細胞を含み得る液体試料である。病原体としては、ウイルス、真菌類、蠕虫類、原虫動物、マラリア原虫、プラスモディウム（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）寄生虫、トキソプラズマ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ）寄生虫、シストソーマ（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ）寄生虫等が挙げられる。「蠕虫類」としては、回虫、犬糸状虫、及び植物食性線虫（ネマトーダ（Ｎｅｍａｔｏｄａ））、吸虫（テマトーダ（Ｔｅｍａｔｏｄａ））、鉤頭虫門、及び条虫（セストーダ（Ｃｅｓｔｏｄａ））が挙げられる。原虫感染症としては、ジアルジア（Ｇｉａｒｄｉａ）種属、トリコモナス（Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ）種属からの感染症、アフリカトリパノソーマ症、アメーバ赤痢、バベシア症、バランチジウム赤痢、シャーガス病、コクシジウム症、マラリア、及びトキソプラズマ症が挙げられる。寄生虫性／原生動物性病原体等の病原体の例としては、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、トリパノソーマ・クルージ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ）、及びトキソプラズマ・ゴンヂ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ）が挙げられるが、これらに限定されない。真菌性病原体としては、クリプトコックス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）、コクシジオイデス・イミチス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓ）、ブラストマイセス・デルマチチジス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）、クラミジア・トラコマチス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、及びカンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）が挙げられるが、これらに限定されない。病原性ウイルスとしては、例えば、免疫不全ウイルス（例えば、ＨＩＶ）、インフルエンザウイルス、デング、西ナイルウイルス、ヘルペスウイルス、黄熱病ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、パピローマウイルス等が挙げられる。病原性ウイルスとしては、パポバウイルス（例えば、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ポリオーマウイルス）、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ））、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスリンパ球向性ウイルス、バラ色粃糠疹、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス）、アデノウイルス（例えば、アタデノウイルス、アビアデノウイルス、イクタデノウイルス、マストアデノウイルス、シアデノウイルス）、ポックスウイルス（例えば、天然痘、ワクシニアウイルス、牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、オルフウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウイルス、タナ痘ウイルス、ヤバサル腫瘍ウイルス、伝染性軟属腫ウイルス（ＭＣＶ））、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、パルボウイルスＢ１９、ヒトボカウイルス、ブファウイルス、ヒトｐａｒｖ４ Ｇ１）、ジェミニウイルス科、ナノウイルス科、フィコドナウイルス科等のＤＮＡウイルス等が挙げられ得る。病原体としては、例えば、ＤＮＡウイルス（例えば、パポバウイルス（例えば、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ポリオーマウイルス）、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ））、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスリンパ球向性ウイルス、バラ色粃糠疹、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス）、アデノウイルス（例えば、アタデノウイルス、アビアデノウイルス、イクタデノウイルス、マストアデノウイルス、シアデノウイルス）、ポックスウイルス（例えば、天然痘、ワクシニアウイルス、牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、オルフウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウイルス、タナ痘ウイルス、ヤバサル腫瘍ウイルス、伝染性軟属腫ウイルス（ＭＣＶ））、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、パルボウイルスＢ１９、ヒトボカウイルス、ブファウイルス、ヒトｐａｒｖ４ Ｇ１）、ジェミニウイルス科、ナノウイルス科、フィコドナウイルス科等］、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、ストレプトコッ

カス・アガラクティエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、メチシリン耐性の黄色ブドウ球菌、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、ナイセリア・ゴノレエ（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、ナイセリア・メニンジティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、ニューモコッカス（Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ）、クリプトコックス・ネオフォルマンス、ヒストプラスマ・カプスラーツム、ヘモフィルスインフルエンザ菌Ｂ型、トレポネーマ・パリダム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）、ライム病スピロヘータ、シュードモナス・アエルギノーザ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、マイコバクテリウム・レプレ（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ）、ブルセラ・アボルタス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ａｂｏｒｔｕｓ）、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスＩ型、単純ヘルペスウイルスＩＩ型、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトＴ細胞白血病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、いぼウイルス、ブルータングウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、サルウイルス４０、マウス乳房腫瘍ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、西ナイルウイルス、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、トキソプラズマ・ゴンヂ、ランゲルトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｒａｎｇｅｌｉ）、トリパノソーマ・クルージ、ローデシアトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｒｈｏｄｅｓｉｅｎｓｅ）、トリパノソーマ・ブルーセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）、シストソーマ・マンソニ（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｍａｎｓｏｎｉ）、シストソーマ・ジャポニクム（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｊａｐｏｎｉｃｕｍ）、バベシア・ボービス（Ｂａｂｅｓｉａ ｂｏｖｉｓ）、エイメリア・テネラ（Ｅｉｍｅｒｉａ ｔｅｎｅｌｌａ）、オンコセルカ・ボルブルス（Ｏｎｃｈｏｃｅｒｃａ ｖｏｌｖｕｌｕｓ）、リーシュマニア・トロピカ（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｔｒｏｐｉｃａ、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、旋毛虫（Ｔｒｉｃｈｉｎｅｌｌａ ｓｐｉｒａｌｉｓ）、タイレリア・パルバ（Ｔｈｅｉｌｅｒｉａ ｐａｒｖａ）、胞状条虫（Ｔａｅｎｉａ ｈｙｄａｔｉｇｅｎａ）、ヒツジ条虫（Ｔａｅｎｉａ ｏｖｉｓ）、無鉤条虫（Ｔａｅｎｉａ ｓａｇｉｎａｔａ）、単包条虫（Ｅｃｈｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｇｒａｎｕｌｏｓｕｓ）、メソセストイデス・コルティ（Ｍｅｓｏｃｅｓｔｏｉｄｅｓ ｃｏｒｔｉ）、マイコプラズマ・アルスリティディス（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ）、Ｍ．ヒオルヒニス（Ｍ．ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ）、Ｍ．オラレ（Ｍ．ｏｒａｌｅ）、Ｍ．アルギニニ（Ｍ．ａｒｇｉｎｉｎｉ）、アコレプラズマ・ライドラウィー（Ａｃｈｏｌｅｐｌａｓｍａ ｌａｉｄｌａｗｉｉ）、Ｍ．サリバリウム（Ｍ．ｓａｌｉｖａｒｉｕｍ）及びＭ．ニューモニエ（Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）が挙げられ得る。

【０４０４】

検出可能なシグナルの測定

場合によっては、対象の方法は、測定（例えば、Ｃａｓ１２Ｌ媒介型ｓｓＤＮＡ切断によって生成される検出可能なシグナルの測定）のステップを含む。本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドは、一度活性化されると（これはガイドＲＮＡがＣａｓ１２Ｌエフェクタータンパク質の存在下で標的ＤＮＡとハイブリダイズするときに起こる）標的とされていないｓｓＤＮＡを切断するため、検出可能なシグナルは、ｓｓＤＮＡが切断されるときに生成される任意のシグナルであり得る。例えば、場合によっては、測定ステップは、金ナノ粒子ベースの検出（例えば、Ｘｕ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ．２００７；４６（１９）：３４６８－７０、及びＸｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１０ Ｊｕｎ １５；１０７（２４）：１０８３７－４１を参照されたい）、蛍光偏光、コロイド相転移／分散（例えば、Ｂ

ａｋｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２００４　Ｊａｎ　８；４２７（６９７０）：１３９－４１を参照されたい）、電気化学検出、半導体ベースの感知（例えば、Ｒｏｔｈｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ．２０１１　Ｊｕｌ　２０；４７５（７３５６）：３４８－５２、例えば、ホスファターゼを使用して、２’－３’環状ホスフェートの開裂によって、及び溶液中への無機ホスフェートの放出によって、ｓｓＤＮＡ切断反応後にｐＨ変化を生じさせることができる）、及び標識された検出器ｓｓＤＮＡの検出（さらなる詳細については本明細書の他の箇所を参照されたい）のうちの１つ以上を含み得る。そのような検出方法の読み出しは、任意の簡便な読み出しであり得る。可能性のある読み出しの例としては、検出可能な蛍光シグナルの測定量、ゲル上のバンド（例えば、未切断基質に対して切断生成物を表すバンド）の視覚的分析、色の存在または不在の視覚的またはセンサーベースの検出（すなわち、色検出法）、及び電気シグナル（もしくはその特定の量）の存在または不在が挙げられるが、それらに限定されない。

【０４０５】

場合によっては、測定は、例えば、検出されるシグナルの量を使用して、試料中に存在する標的ＤＮＡの量を決定することができるという意味において、定量的であり得る。場合によっては、測定は、例えば、検出可能なシグナルの存在または不在が、標的とされたＤＮＡ（例えば、ウイルス、ＳＮＰ等）の存在または不在を示し得るという意味において、定性的であり得る。場合によっては、検出可能なシグナルは、標的とされたＤＮＡ（複数可）（例えば、ウイルス、ＳＮＰ等）が特定の閾値濃度を上回って存在しない限り、（例えば、所与の閾値レベルを上回って）存在しない。場合によっては、検出閾値は、Ｃａｓ１２Ｌエフェクター、ガイドＲＮＡ、試料体積、及び／または検出器ｓｓＤＮＡ（使用される場合）の量を変更することによって滴定することができる。したがって、例えば、当業者には理解されようが、所望であれば、いくつかの対照を、１つ以上の反応をセットアップするために使用することができ、各々が、異なる閾値レベルの標的ＤＮＡを検出するためにセットアップされ、したがって、そのような一連の反応を使用して試料中に存在する標的ＤＮＡの量を決定することができる（例えば、そのような一連の反応を使用して、「少なくともＸの濃度で」試料中に存在する標的ＤＮＡを決定することができる）。

【０４０６】

本開示の検出方法の使用の例としては、例えば、一塩基多型（ＳＮＰ）の検出、がんのスクリーニング、細菌感染の検出、抗生物質耐性の検出、ウイルス感染の検出等が挙げられる。本開示の組成物及び方法を使用して、任意のＤＮＡ標的を検出することができる。例えば、対象試料は細胞ゲノムＤＮＡを含み得るため、核酸材料をゲノムに組み込むいかなるウイルスも検出することができ、ガイドＲＮＡは、組み込まれたヌクレオチド配列を検出するように設計することができる。

【０４０７】

場合によっては、本開示の方法を使用して、試料（例えば、標的ＤＮＡ及び複数の非標的ＤＮＡを含む試料）中の標的ＤＮＡの量を決定することができる。試料中の標的ＤＮＡの量を決定することは、試験試料から発生した検出可能なシグナルの量を、参照試料から発生した検出可能なシグナルの量と比較することを含み得る。試料中の標的ＤＮＡの量を決定することは、検出可能なシグナルを測定して試験測定値を得ることと、参照試料によって生成される検出可能なシグナルを測定して、参照測定値を得ることと、試験測定値を参照測定値と比較して、試料中に存在する標的ＤＮＡの量を決定することとを含み得る。

【０４０８】

例えば、場合によっては、試料中の標的ＤＮＡの量を決定するための本開示の方法は、ａ）試料（例えば、標的ＤＮＡ及び複数の非標的ＤＮＡを含む試料）を、（ｉ）標的ＤＮＡとハイブリダイズするガイドＲＮＡ、（ｉｉ）試料中に存在するＲＮＡを切断する本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、及び（ｉｉｉ）検出器ｓｓＤＮＡと接触させることと、ｂ）Ｃａｓ１２Ｌ媒介型ｓｓＤＮＡ切断（例えば、検出器ｓｓＤＮＡの切断）によって生成される検出可能なシグナルを測定して、試験測定値を得ることと、ｃ）参照試料によって生成される検出可能な信号を測定して、参照測定値を得ることと、ｄ）試験測定値を参

照測定値と比較して、試料中の標的ＤＮＡの量を決定することとを含む。
【０４０９】
別の例としては、場合によっては、試料中の標的ＤＮＡの量を決定するための本開示の方法は、ａ）試料（例えば、標的ＤＮＡ及び複数の非標的ＤＮＡを含む試料）を、（ｉ）各々が異なるガイド配列を有する、２つ以上のガイドＲＮＡを含む前駆体ガイドＲＮＡアレイ、（ｉｉ）前駆体ガイドＲＮＡアレイを個々のガイドＲＮＡに切断し、かつ試料のＲＮＡも切断する本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、（ｉｉｉ）検出器ｓｓＤＮＡと接触させることと、ｂ）Ｃａｓ１２Ｌ媒介型ｓｓＤＮＡ切断（例えば、検出器ｓｓＤＮＡの切断）によって生成される検出可能なシグナルを測定して、試験測定値を得ることと、ｃ）２つ以上の参照試料の各々によって生成される検出可能なシグナルを測定して、２つ以上の参照測定値を得ることと、ｄ）試験測定値を参照測定値と比較して、試料中に存在する標的ＤＮＡの量を決定することとを含む。
【０４１０】
試料中の核酸の増幅
いくつかの実施形態では、（例えば、細胞ゲノムＤＮＡ中のウイルスＤＮＡまたはＳＮＰ等の標的ＤＮＡの存在を検出するための）対象の組成物及び／または方法の感度は、検出を核酸増幅に結び付けることによって増加させることができる。場合によっては、試料中の核酸は、ｓｓＤＮＡを切断する本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと接触させる前に増幅される（例えば、試料中の核酸の増幅は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドとの接触前に開始することができる）。場合によっては、試料中の核酸は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドとの接触と同時に増幅される。例えば、場合によっては、対象の方法は、増幅された試料を本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと接触させる前に（例えば、試料を増幅構成要素と接触させることによって）試料の核酸を増幅することを含む。場合によっては、対象の方法は、試料を本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと接触させるのと同時点で（それと同時に）試料を増幅構成要素と接触させることを含む。全ての構成要素（増幅構成要素及び検出構成要素、例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、ガイドＲＮＡ、及び検出器ＤＮＡ）が同時に付加される場合、Ｃａｓ１２Ｌのトランス切断活性は、核酸が増幅を経ているのと同時点で試料の核酸を分解し始めることが可能である。しかしながら、これに該当する場合であっても、増幅及び検出を同時に行うことは、増幅せずに本方法を実施するのと比較して、依然として感度を増加させ得る。
【０４１１】
場合によっては、特定の配列（例えば、ウイルスの配列、関心対象のＳＮＰを含む配列）は、例えば、プライマーを使用して、試料から増幅される。このように、ガイドＲＮＡがハイブリダイズするであろう配列は、対象の検出方法の感度を増加させるために増幅され得、これにより、試料中に存在する他の配列と比較して試料中に存在する関心対象の配列のコピー数を増加させるために、所望の配列の偏った増幅を達成することができる。例示的な一例として、所与の試料が特定のウイルス（または特定のＳＮＰ）を含むかどうかを決定するために対象の方法が使用されている場合、ウイルス配列（または非ウイルスゲノム配列）の所望の領域が増幅され得、増幅された領域は、ウイルス配列（またはＳＮＰ）が実際に試料中に存在した場合にガイドＲＮＡにハイブリダイズするであろう配列を含む。
【０４１２】
上述したように、場合によっては、増幅された核酸を本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと接触させる前に（例えば、増幅構成要素と接触させることによって）核酸は増幅される。場合によっては、増幅は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと接触させる前に１０秒間以上（例えば、３０秒間以上、４５秒間以上、１分間以上、２分間以上、３分間以上、４分間以上、５分間以上、７．５分間以上、１０分間以上等）生じる。場合によっては、増幅は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと接触させる前に２分間以上（例えば、３分間以上、４分間以上、５分間以上、７．５分間以上、１０分間以上等）生じる。場合によっては、増幅は、１０秒間～６０分間（例えば、１０秒間～４０分間、１０秒間～３０

分間、１０秒間～２０分間、１０秒間～１５分間、１０秒間～１０分間、１０秒間～５分間、３０秒間～４０分間、３０秒間～３０分間、３０秒間～２０分間、３０秒間～１５分間、３０秒間～１０分間、３０秒間～５分間、１分間～４０分間、１分間～３０分間、１分間～２０分間、１分間～１５分間、１分間～１０分間、１分間～５分間、２分間～４０分間、２分間～３０分間、２分間～２０分間、２分間～１５分間、２分間～１０分間、２分間～５分間、５分間～４０分間、５分間～３０分間、５分間～２０分間、５分間～１５分間、または５分間～１０分間）の範囲の期間にわたって生じる。場合によっては、増幅は、５分間～１５分間の範囲の期間にわたって生じる。場合によっては、増幅は、７分間～１２分間の範囲の期間にわたって生じる。

【０４１３】

場合によっては、試料は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドと接触させるのと同時点で増幅構成要素と接触させられる。いくつかのそのような場合には、Ｃａｓ１２Ｌタンパク質は、接触時に不活性であり、試料中の核酸が一度増幅されると活性化される。

【０４１４】

様々な増幅方法及び構成要素が当業者に既知であり、任意の簡便な方法を使用することができる（例えば、Ｚａｎｏｌｉ ａｎｄ Ｓｐｏｔｏ，Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒｓ（Ｂａｓｅｌ）．２０１３ Ｍａｒ；３（１）：１８－４３、Ｇｉｌｌ ａｎｄ Ｇｈａｅｍｉ，Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ，Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，ａｎｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，２００８，２７：２２４－２４３、Ｃｒａｗ ａｎｄ Ｂａｌａｃｈａｎｄｒａｎａ，Ｌａｂ Ｃｈｉｐ，２０１２，１２，２４６９－２４８６を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。核酸増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）、逆転写ｑＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）、ネステッドＰＣＲ、マルチプレックスＰＣＲ、非対称ＰＣＲ、タッチダウンＰＣＲ、ランダムプライマーＰＣＲ、ヘミネステッドＰＣＲ、ポリメラーゼサイクリングアセンブリ（ＰＣＡ）、コロニーＰＣＲ、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、デジタルＰＣＲ、メチル化特異的ＰＣＲ（ＭＳＰ）、より低い変性温度での同時増幅ＰＣＲ（ＣＯＬＤ－ＰＣＲ）、アレル特異的ＰＣＲ、配列間特異的ＰＣＲ（ＩＳＳ－ＰＣＲ）、全ゲノム増幅（ＷＧＡ）、逆ＰＣＲ、及び熱非対称インターレースＰＣＲ（ＴＡＩＬ－ＰＣＲ）を含み得る。

【０４１５】

場合によっては、増幅は等温増幅である。「等温増幅」という用語は、単一温度のインキュベーションを使用することによってサーマルサイクラーを不要とすることができる、（例えば、酵素連鎖反応を使用する）核酸（例えば、ＤＮＡ）増幅の方法を示す。等温増幅は、増幅反応中の標的核酸の熱変性に依存せず、したがって、温度の複数の急激な変化を必要としない場合がある、核酸増幅の一形態である。したがって、等温核酸増幅方法は、実験室環境の内部または外部で行うことができる。逆転写ステップと組み合わせることによって、これらの増幅方法を使用して、ＲＮＡを等温的に増幅することができる。

【０４１６】

等温増幅方法の例としては、ループ介在等温増幅（ＬＡＭＰ）、ヘリカーゼ依存型増幅（ＨＤＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、核酸配列ベースの増幅（ＮＡＳＢＡ）、転写媒介増幅（ＴＭＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、複数置換増幅（ＭＤＡ）、分岐（ＲＡＭ）、環状ヘリカーゼ依存型増幅（ＣＨＤＡ）、単一プライマー等温増幅（ＳＰＩＡ）、ＲＮＡ技術のシグナル媒介増幅（ＳＭＡＲＴ）、自家持続配列複製（３ＳＲ）、ゲノムの指数的増幅反応（ＧＥＡＲ）、及び等温複数置換増幅（ＩＭＤＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４１７】

場合によっては、増幅は、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）である（例えば、米国特許第８，０３０，０００号、同第８，４２６，１３４号、同第８，９４５，８４５号、同第９，３０９，５０２号、及び同第９，６６３，８２０号を参照されたい（参照

によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる））。リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）は、２つの相反のプライマーを使用し（ＰＣＲとよく似ている）、３つの酵素、すなわちリコンビナーゼ、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、及び鎖置換ポリメラーゼを用いる。リコンビナーゼはオリゴヌクレオチドプライマーを二本鎖ＤＮＡ中の相同配列と対合し、ＳＳＢはＤＮＡの置換された鎖に結合して、プライマーが置換されることを阻止し、鎖置換ポリメラーゼは、プライマーが標的ＤＮＡに結合した場所でＤＮＡ合成を開始する。ＲＰＡ反応に逆転写酵素を添加して、ｃＤＮＡを生成するための別個のステップを必要とすることなく、ＲＮＡならびにＤＮＡの検出を容易にすることができる。ＲＰＡ反応のための構成要素の一例は、以下の通りである（例えば、米国特許第８，０３０，０００号、同第８，４２６，１３４号、同第８，９４５，８４５号、同第９，３０９，５０２号、同第９，６６３，８２０号を参照されたい）：５０ｍＭのトリス（ｐＨ８．４）、８０ｍＭの酢酸カリウム、１０ｍＭの酢酸マグネシウム、２ｍＭのＤＴＴ、５％のＰＥＧ化合物（Ｃａｒｂｏｗａｘ－２０Ｍ）、３ｍＭのＡＴＰ、３０ｍＭのホスホクレアチン、１００ｎｇ／μｌのクレアチンキナーゼ、４２０ｎｇ／μｌのｇｐ３２、１４０ｎｇ／μｌのＵｖｓＸ、３５ｎｇ／μｌのＵｖｓＹ、２０００ＭのｄＮＴＰ、３００ｎＭの各オリゴヌクレオチド、３５ｎｇ／μｌのＢｓｕポリメラーゼ、及び核酸含有試料）。

【０４１８】

転写媒介増幅（ＴＭＡ）では、ＲＮＡポリメラーゼを使用して、プライマー領域において操作されたプロモーターからＲＮＡが作製され、次いで、逆転写酵素が、プライマーからｃＤＮＡを合成する。次いで、第３の酵素、例えば、Ｒｎａｓｅ　Ｈを使用して、熱変性ステップなしにｃＤＮＡからＲＮＡ標的を分解することができる。この増幅技法は、自家持続配列複製（３ＳＲ）及び核酸配列ベースの増幅（ＮＡＳＢＡ）と類似しているが、用いられる酵素が異なる。別の例として、ヘリカーゼ依存型増幅（ＨＤＡ）は、ｄｓＤＮＡをほどいて一本鎖を作成するために、熱ではなく熱安定性ヘリカーゼ（Ｔｔｅ－ＵｖｒＤ）を利用し、次いで、この一本鎖が、ハイブリダイゼーション及びポリメラーゼによるプライマーの伸長のために利用可能である。さらに別の例として、ループ介在増幅（ＬＡＭＰ）は、鎖置換能力を有する熱安定性ポリメラーゼ、及び４つ以上の特異的に設計されたプライマーのセットを用いる。各プライマーは、一度置換されるとヘアピンにはめ込まれて、セルフプライミングを容易にすると共にポリメラーゼ伸長を促進する、ヘアピン末端を有するように設計される。ＬＡＭＰ反応では、反応は等温条件下で進行するが、二本鎖標的のために最初の熱変性ステップが必要とされる。加えて、増幅は、様々な長さの生成物のラダーパターンを生み出す。さらに別の例として、鎖置換増幅（ＳＤＡ）は、制限エンドヌクレアーゼがその標的ＤＮＡの非修飾鎖をニッキングする能力と、エキソヌクレアーゼ欠損ＤＮＡポリメラーゼがニックにて３’末端を伸長して下流のＤＮＡ鎖を置換する能力とを組み合わせる。

【０４１９】

検出器ＤＮＡ

場合によっては、対象の方法は、試料（例えば、標的ＤＮＡ及び複数の非標的ｓｓＤＮＡを含む試料）を、ｉ）本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチド、ｉｉ）ガイドＲＮＡ（または前駆体ガイドＲＮＡアレイ）、及びｉｉｉ）一本鎖であり、かつガイドＲＮＡのガイド配列とハイブリダイズしない検出器ＤＮＡと接触させることを含む。例えば、場合によっては、対象の方法は、試料を、蛍光発光色素対を含む標識された一本鎖検出器ＤＮＡ（検出器ｓｓＤＮＡ）、（ガイドＲＮＡが標的ＤＮＡにハイブリダイズする関連においてガイドＲＮＡに結合することによって）活性化された後に標識された検出器ｓｓＤＮＡを切断するＣａｓ１２Ｌポリペプチド、及び蛍光発光色素対によって生成される、測定される検出可能なシグナルと接触させることを含む。例えば、場合によっては、対象の方法は、試料を、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対、もしくはクエンチャー／蛍光体対、またはそれら両方を含む、標識された検出器ｓｓＤＮＡと接触させることを含む。場合によっては、対象の方法は、試料を、ＦＲＥＴ対を含む標識された検出器ｓｓＤＮＡと接触させることを含む。場合によっては、対象の方法は、試料を、蛍光体／クエンチャー対を含む

標識された検出器ｓｓＤＮＡと接触させることを含む。

【０４２０】

蛍光発光色素対は、ＦＲＥＴ対またはクエンチャー／蛍光体対を含む。ＦＲＥＴ対及びクエンチャー／蛍光体対の両方の場合において、色素のうちの一方の発光スペクトルは、対における他方の色素の吸収スペクトルの領域と重複する。本明細書で使用される場合、「蛍光発光色素対」という用語は、「蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対」及び「クエンチャー／蛍光体対」（いずれの用語も以下でより詳細に考察される）の両方を包含するように使用される総称である。「蛍光発光色素対」という用語は、「ＦＲＥＴ対及び／またはクエンチャー／蛍光体対」という表現と互換的に使用される。

【０４２１】

場合によっては（例えば、検出器ｓｓＤＮＡが、ＦＲＥＴ対を含む場合）、標識された検出器ｓｓＤＮＡは、切断される前にある量の検出可能なシグナルを生成し、測定される検出可能なシグナルの量は、標識された検出器ｓｓＤＮＡが切断される場合、低減される。場合によっては、標識された検出器ｓｓＤＮＡは、（例えば、ＦＲＥＴ対から）切断される前に第１の検出可能なシグナルを生成し、標識された検出器ｓｓＤＮＡが（例えば、クエンチャー／蛍光体対から）切断される場合、第２の検出可能なシグナルを生成する。したがって、場合によっては、標識された検出器ｓｓＤＮＡは、ＦＲＥＴ対及びクエンチャー／蛍光体対を含む。

【０４２２】

場合によっては、標識された検出器ｓｓＤＮＡは、ＦＲＥＴ対を含む。ＦＲＥＴは、励起状態のフルオロフォアから至近の第２の発色団へのエネルギーの無放射移動が生じるプロセスである。エネルギー移動が起こり得る範囲は、およそ１０ナノメートル（１００オングストローム）に限定され、移動の効率は、フルオロフォア間の分離距離に極めて敏感である。したがって、本明細書で使用される場合、「ＦＲＥＴ」（「蛍光共鳴エネルギー移動」）（「Ｆｏｒｓｔｅｒ共鳴エネルギー移動」としても知られる）という用語は、ドナーの発光スペクトルがアクセプターの励起スペクトルと重複するように選択され、さらに、ドナー及びアクセプターが互いに至近する（通常１０ｎｍ以下）場合、量子結合効果を介してエネルギーの一部がドナーからアクセプターへ受け渡される際に、ドナーの励起がアクセプターの励起及びそれからの発光を引き起こすように選択された、ドナーフルオロフォア及び一致するアクセプターフルオロフォアが関与する物理現象を指す。したがって、ＦＲＥＴシグナルは、ドナー及びアクセプターの近接ゲージとして機能し、すなわち、それらが互いに至近する場合にのみシグナルが発生する。ＦＲＥＴドナー部分（例えば、ドナーフルオロフォア）及びＦＲＥＴアクセプター部分（例えば、アクセプターフルオロフォア）は、本明細書では総称的に「ＦＲＥＴ対」と称される。

【０４２３】

ドナーアクセプター対（ＦＲＥＴドナー部分及びＦＲＥＴアクセプター部分）は、本明細書では「ＦＲＥＴ対」または「シグナルＦＲＥＴ対」と称される。したがって、場合によっては、対象の標識された検出器ｓｓＤＮＡは、２つのシグナルパートナー（シグナル対）を含み、一方のシグナルパートナーがＦＲＥＴドナー部分である場合、他方のシグナルパートナーはＦＲＥＴアクセプター部分である。したがって、そのようなＦＲＥＴ対（ＦＲＥＴドナー部分及びＦＲＥＴアクセプター部分）を含む、対象の標識された検出器ｓｓＤＮＡは、シグナルパートナーが至近する場合（例えば、同じＲＮＡ分子上にある間）は、検出可能なシグナル（ＦＲＥＴシグナル）を示すであろうが、パートナーが分離している場合（例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドによる ＲＮＡ分子の切断後）は、シグナルは低減される（または不在である）。

【０４２４】

ＦＲＥＴドナー及びアクセプター部分（ＦＲＥＴ対）は当業者に既知であり、任意の簡便なＦＲＥＴ対（例えば、任意の簡便なドナー及びアクセプター部分の対）を使用することができる。好適なＦＲＥＴ対の例としては、表１に提示されるものが挙げられるが、それらに限定されない。また、Ｂａｊａｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｅｎｓｏｒｓ（Ｂａｓｅｌ）．

２０１６　Ｓｅｐ　１４；１６（９）、及びＡｂｒａｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．２０１５　Ａｕｇ　３；１０（８）：ｅ０１３４４３６も参照されたい。

【０４２５】

（表１）ＦＲＥＴ対（ドナー及びアクセプターＦＲＥＴ部分）の例

ドナー	アクセプター
トリプトファン	ダンシル
IAEDANS(1)	DDPM(2)
BFP	DsRFP
ダンシル	フルオレセインイソチオシアネート(FITC)
ダンシル	オクタデシルローダミン
シアン蛍光タンパク質(CFP)	緑色蛍光タンパク質(GFP)
CF(3)	テキサスレッド
フルオレセイン	テトラメチルローダミン
Cy3	Cy5
GFP	黄色蛍光タンパク質(YFP)
BODIPY FL(4)	BODIPY FL(4)
ローダミン 110	Cy3
ローダミン 6G	マラカイトグリーン
FITC	エオシンチオセミカルバジド
B-フィコエリトリン	Cy5
Cy5	Cy5.5

（１）５－（２－ヨードアセチルアミノエチル）アミノナフタレン－１－スルホン酸

（２）Ｎ－（４－ジメチルアミノ－３，５－ジニトロフェニル）マレイミド

（３）カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル

（４）４，４－ジフルオロ－４－ボラ－３ａ，４ａ－ジアザ－ｓ－インダセン

【０４２６】

場合によっては、検出可能なシグナルは、標識された検出器ｓｓＤＮＡが切断されると生成される（例えば、場合によっては、標識された検出器ｓｓＤＮＡは、クエンチャー／蛍光体対を含む）。シグナルクエンチング対の一方のシグナルパートナーは、検出可能なシグナルを生成し、他方のシグナルパートナーは、第１のシグナルパートナーの検出可能なシグナルを消光するクエンチャー部分である（すなわち、クエンチャー部分はシグナル部分のシグナルを消光し、これによりシグナルパートナーが互いに近接する場合に、例えば、シグナル対のシグナルパートナーが至近する場合に、シグナル部分からのシグナルが低減される（消光される））。

【０４２７】

例えば、場合によっては、検出可能なシグナルの量は、標識された検出器ｓｓＤＮＡが切断されると増加する。例えば、場合によっては、一方のシグナルパートナー（シグナル部分）によって示されるシグナルは、他方のシグナルパートナー（クエンチャ―シグナル部分）によって消光される（例えば、両方が、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドによる切断の前に同じｓｓＤＮＡ分子上に存在する場合）。そのようなシグナル対は、本明細書において「クエンチャー／蛍光体対」、「クエンチング対」、または「シグナルクエンチング対」と称される。例えば、場合によっては、一方のシグナルパートナー（例えば、第１のシグナルパートナー）は、第２のシグナルパートナー（例えば、クエンチャー部分）

によって消光される検出可能なシグナルを生成するシグナル部分である。したがって、そのようなクエンチャー／蛍光体対のシグナルパートナーは、（例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドによる検出器ｓｓＤＮＡの切断後に）パートナーが分離された場合、検出可能なシグナルを生成するであろうが、（例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドによる検出器ｓｓＤＮＡの切断前に）パートナーが至近する場合、シグナルは消光されるであろう。

【０４２８】

クエンチャー部分は、（例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドによる検出器ｓｓＤＮＡの切断前に）シグナル部分からのシグナルを様々な程度に消光することができる。場合によっては、クエンチャー部分は、シグナル部分からのシグナルをクエンチし、ここで、クエンチャー部分の存在下で（シグナルパートナーが互いに近接する場合に）検出されるシグナルは、クエンチャー部分の不在下で（シグナルパートナーが分離されている場合に）検出されるシグナルの９５％以下である。例えば、場合によっては、クエンチャー部分の存在下で検出されるシグナルは、クエンチャー部分の不在下で検出されるシグナルの９０％以下、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、４０％以下、３０％以下、２０％以下、１５％以下、１０％以下、または５％以下である。場合によっては、（例えば、バックグラウンドを上回る）シグナルは、クエンチャー部分の存在下では検出されない。

【０４２９】

場合によっては、クエンチャー部分の不在下で（シグナルパートナーが分離されている場合に）検出されるシグナルは、クエンチャー部分の存在下で（シグナルパートナーが互いに近接する場合に）検出されるシグナルよりも少なくとも１．２倍大きい（例えば、少なくとも１．３倍、少なくとも１．５倍、少なくとも１．７倍、少なくとも２倍、少なくとも２．５倍、少なくとも３倍、少なくとも３．５倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも７倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、または少なくとも５０倍大きい）。

【０４３０】

場合によっては、シグナル部分は、蛍光標識である。いくつかのこのような場合では、クエンチャー部分は、蛍光標識からのシグナル（光シグナル）を（例えば、標識の発光スペクトルのエネルギーを吸収することによって）消光する。したがって、クエンチャー部分がシグナル部分に近接していない場合、シグナルはクエンチャー部分によって吸収されないため、蛍光標識からの発光（シグナル）が検出可能である。任意の簡便なドナーアクセプター対（シグナル部分／クエンチャー部分の対）を使用することができ、多くの好適な対が当該技術分野で既知である。

【０４３１】

場合によっては、クエンチャー部分は、シグナル部分（本明細書では「検出可能な標識」とも称される）からのエネルギーを吸収し、次いでシグナル（例えば、異なる波長の光）を発光する。したがって、場合によっては、クエンチャー部分はそれ自体がシグナル部分であり（例えば、シグナル部分は、６－カルボキシフルオレセインであり得、一方でクエンチャー部分は、６－カルボキシ－テトラメチルローダミンであり得る）、いくつかのそのような場合では、対はまた、ＦＲＥＴ対でもあり得る。場合によっては、クエンチャー部分は、ダーククエンチャーである。ダーククエンチャーは、励起エネルギーを吸収し、エネルギーを別の方式で（例えば、熱として）消散することができる。したがって、ダーククエンチャーは、それ自体は最小の蛍光を有するか、または蛍光を有しない（蛍光を発光しない）。ダーククエンチャーの例は、米国特許第８，８２２，６７３号、及び同第８，５８６，７１８号、米国特許公開２０１４０３７８３３０、２０１４０３４９２９５、及び２０１４０１９４６１１号、ならびに国際特許出願ＷＯ２００１４２５０５、及びＷＯ２００１８６００１にさらに記載され、これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に含まれる。

【０４３２】

蛍光標識の例としては、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素、ＡＴＴＯ色素（例えば、ＡＴＴＯ　３９０、ＡＴＴＯ　４２５、ＡＴＴＯ４６５、ＡＴＴＯ　４８８、ＡＴＴＯ　４９５、ＡＴＴＯ　５１４、ＡＴＴＯ　５２０、ＡＴＴＯ　５３２、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ６Ｇ　、ＡＴＴＯ　５４２、ＡＴＴＯ　５５０、ＡＴＴＯ　５６５、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ３Ｂ、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１１、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１２、ＡＴＴＯ　Ｔｈｉｏ１２、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１０１、ＡＴＴＯ　５９０、ＡＴＴＯ　５９４、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１３、ＡＴＴＯ　６１０、ＡＴＴＯ　６２０、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１４、ＡＴＴＯ　６３３、ＡＴＴＯ　６４７、ＡＴＴＯ　６４７Ｎ、ＡＴＴＯ　６５５、ＡＴＴＯ　Ｏｘａ１２、ＡＴＴＯ　６６５、ＡＴＴＯ　６８０、ＡＴＴＯ　７００、ＡＴＴＯ　７２５、ＡＴＴＯ　７４０）、ＤｙＬｉｇｈｔ色素、シアニン色素（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ３ｂ、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、Ｃｙ７．５）、ＦｌｕｏＰｒｏｂｅｓ色素、Ｓｕｌｆｏ　Ｃｙ色素、Ｓｅｔａ色素、ＩＲＩＳ色素、ＳｅＴａｕ色素、ＳＲｆｌｕｏｒ色素、Ｓｑｕａｒｅ色素、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、テトラメチルローダミン（ＴＲＩＴＣ）、テキサスレッド、オレゴングリーン、パシフィックブルー、パシフィックグリーン（Ｐａｃｉｆｉｃ　Ｇｒｅｅｎ）、パシフィックオレンジ（Ｐａｃｉｆｉｃ　Ｏｒａｎｇｅ）、量子ドット、及びテザー蛍光タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３３】

場合によっては、検出可能な標識は、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素、ＡＴＴＯ色素（例えば、ＡＴＴＯ　３９０、ＡＴＴＯ　４２５、ＡＴＴＯ４６５、ＡＴＴＯ　４８８、ＡＴＴＯ　４９５、ＡＴＴＯ　５１４、ＡＴＴＯ　５２０、ＡＴＴＯ　５３２、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ６Ｇ　、ＡＴＴＯ　５４２、ＡＴＴＯ　５５０、ＡＴＴＯ　５６５、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ３Ｂ、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１１、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１２、ＡＴＴＯ　Ｔｈｉｏ１２、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１０１、ＡＴＴＯ　５９０、ＡＴＴＯ　５９４、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１３、ＡＴＴＯ　６１０、ＡＴＴＯ　６２０、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１４、ＡＴＴＯ　６３３、ＡＴＴＯ　６４７、ＡＴＴＯ　６４７Ｎ、ＡＴＴＯ　６５５、ＡＴＴＯ　Ｏｘａ１２、ＡＴＴＯ　６６５、ＡＴＴＯ　６８０、ＡＴＴＯ　７００、ＡＴＴＯ　７２５、ＡＴＴＯ　７４０）、ＤｙＬｉｇｈｔ色素、シアニン色素（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ３ｂ、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、Ｃｙ７．５）、ＦｌｕｏＰｒｏｂｅｓ色素、Ｓｕｌｆｏ　Ｃｙ色素、Ｓｅｔａ色素、ＩＲＩＳ色素、ＳｅＴａｕ色素、ＳＲｆｌｕｏｒ色素、Ｓｑｕａｒｅ色素、フルオレセイン（ＦＩＴＣ）、テトラメチルローダミン（ＴＲＩＴＣ）、テキサスレッド、オレゴングリーン、パシフィックブルー、パシフィックグリーン、及びパシフィックオレンジから選択される蛍光標識である。

【０４３４】

場合によっては、検出可能な標識は、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素、ＡＴＴＯ色素（例えば、ＡＴＴＯ　３９０、ＡＴＴＯ　４２５、ＡＴＴＯ４６５、ＡＴＴＯ　４８８、ＡＴＴＯ　４９５、ＡＴＴＯ　５１４、ＡＴＴＯ　５２０、ＡＴＴＯ　５３２、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ６Ｇ　、ＡＴＴＯ　５４２、ＡＴＴＯ　５５０、ＡＴＴＯ　５６５、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ３Ｂ、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１１、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１２、ＡＴＴＯ　Ｔｈｉｏ１２、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１０１、ＡＴＴＯ　５９０、ＡＴＴＯ　５９４、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１３、ＡＴＴＯ　６１０、ＡＴＴＯ　６２０、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１４、ＡＴＴＯ　６３３、ＡＴＴＯ　６４７、ＡＴＴＯ　６４７Ｎ、ＡＴＴＯ　６５５、ＡＴＴＯ　Ｏｘａ１２、ＡＴＴＯ　６６５、ＡＴＴＯ　６８０、ＡＴＴＯ　７００、ＡＴＴＯ　７２５、ＡＴＴＯ　７４０）、ＤｙＬｉｇｈｔ色素、シアニン色素（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ３ｂ、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、Ｃｙ７．５）、ＦｌｕｏＰｒｏｂｅｓ色素、Ｓｕｌｆｏ　Ｃｙ色素、Ｓｅｔａ色素、ＩＲＩＳ色素、ＳｅＴａｕ色素、ＳＲｆｌｕｏｒ色素、Ｓｑｕａｒｅ色素、フルオレセイン（ＦＩＴＣ）、テトラメチルローダミン（ＴＲＩＴＣ）、テキサスレッド、オレゴングリーン、パシフィックブルー、パシフィックグリーン、パシフィックオレンジ、量子ドット、及びテザー蛍光タンパク質から選択される蛍光標識である。

【０４３５】
ＡＴＴＯ色素の例としては、ＡＴＴＯ　３９０、ＡＴＴＯ　４２５、ＡＴＴＯ　４６５、ＡＴＴＯ　４８８、ＡＴＴＯ　４９５、ＡＴＴＯ　５１４、ＡＴＴＯ　５２０、ＡＴＴＯ　５３２、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ６Ｇ、ＡＴＴＯ　５４２、ＡＴＴＯ　５５０、ＡＴＴＯ　５６５、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ３Ｂ　、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１１、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１２、ＡＴＴＯ　Ｔｈｉｏ１２、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１０１、ＡＴＴＯ　５９０、ＡＴＴＯ　５９４、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１３、ＡＴＴＯ　６１０、ＡＴＴＯ　６２０、ＡＴＴＯ　Ｒｈｏ１４、ＡＴＴＯ　６３３、ＡＴＴＯ　６４７、ＡＴＴＯ　６４７Ｎ、ＡＴＴＯ　６５５、ＡＴＴＯ　Ｏｘａ１２、ＡＴＴＯ　６６５、ＡＴＴＯ　６８０、ＡＴＴＯ　７００、ＡＴＴＯ　７２５、及びＡＴＴＯ　７４０が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３６】
Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ色素の例としては、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）３５０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４０５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４３０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５００、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５１４、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５３２、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５４６、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５５５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５６８、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５９４、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６１０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６３３、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６３５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６６０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６８０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７００、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７５０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７９０等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３７】
クエンチャー部分の例としては、ダーククエンチャー、Ｂｌａｃｋ　Ｈｏｌｅ　Ｑｕｅｎｃｈｅｒ（登録商標）（ＢＨＱ（登録商標））（例えば、ＢＨＱ－０、ＢＨＱ－１、ＢＨＱ－２、ＢＨＱ－３）、Ｑｘｌクエンチャー、ＡＴＴＯクエンチャー（例えば、ＡＴＴＯ　５４０Ｑ、ＡＴＴＯ　５８０Ｑ、及びＡＴＴＯ　６１２Ｑ）、ジメチルアミノアゾベンゼンスルホン酸（ダブシル）、Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ　ＲＱ、Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ　ＦＱ、ＩＲＤｙｅ　ＱＣ－１、ＱＳＹ色素（例えば、ＱＳＹ　７、ＱＳＹ　９、ＱＳＹ　２１）、ＡｂｓｏｌｕｔｅＱｕｅｎｃｈｅｒ、Ｅｃｌｉｐｓｅ、及び金ナノ粒子等の金属クラスター等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３８】
場合によっては、クエンチャー部分は、ダーククエンチャー、Ｂｌａｃｋ　Ｈｏｌｅ　Ｑｕｅｎｃｈｅｒ（登録商標）（ＢＨＱ（登録商標））（例えば、ＢＨＱ－０、ＢＨＱ－１、ＢＨＱ－２、ＢＨＱ－３）、Ｑｘｌクエンチャー、ＡＴＴＯクエンチャー（例えば、ＡＴＴＯ　５４０Ｑ、ＡＴＴＯ　５８０Ｑ、及びＡＴＴＯ　６１２Ｑ）、ジメチルアミノアゾベンゼンスルホン酸（ダブシル）、Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ　ＲＱ、Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ　ＦＱ、ＩＲＤｙｅ　ＱＣ－１、ＱＳＹ色素（例えば、ＱＳＹ　７、ＱＳＹ　９、ＱＳＹ　２１）、ＡｂｓｏｌｕｔｅＱｕｅｎｃｈｅｒ、Ｅｃｌｉｐｓｅ、及び金属クラスターから選択される。

【０４３９】
ＡＴＴＯクエンチャーの例としては、ＡＴＴＯ　５４０Ｑ、ＡＴＴＯ　５８０Ｑ、及びＡＴＴＯ　６１２Ｑが挙げられるが、これらに限定されない。Ｂｌａｃｋ　Ｈｏｌｅ　Ｑｕｅｎｃｈｅｒ（登録商標）（ＢＨＱ（登録商標））の例としては、ＢＨＱ－０（４９３ｎｍ）、ＢＨＱ－１（５３４ｎｍ）、ＢＨＱ－２（５７９ｎｍ）、ＢＨＱ－３（６７２ｎｍ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４４０】
いくつかの検出可能な標識（例えば、蛍光色素）及び／またはクエンチャー部分の例については、例えば、Ｂａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｂｉｏｍｅｄ　Ｅｎｇ．

２００９；１１：２５－４７、ならびに米国特許第８，８２２，６７３号及び同第８，５８６，７１８号、米国特許公開２０１４０３７８３３０、２０１４０３４９２９５、２０１４０１９４６１１、２０１３０３２３８５１、２０１３０２２４８７１、２０１１０２２３６７７、２０１１０１９０４８６、２０１１０１７２４２０、２００６０１７９５８５、及び２００３０００３４８６、ならびに国際特許出願ＷＯ２００１４２５０５及びＷＯ２００１８６００１を参照されたく、これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０４４１】

場合によっては、標識された検出器ｓｓＤＮＡの切断は、比色分析の読み出しを測定することによって検出することができる。例えば、フルオロフォアの遊離（例えば、ＦＲＥＴ対からの遊離、クエンチャー／蛍光体対からの遊離等）は、検出可能なシグナルの波長シフト（したがって、カラーシフト）をもたらすことができる。したがって、場合によっては、対象の標識された検出器ｓｓＤＮＡの切断は、カラーシフトによって検出することができる。このようなシフトは、ある色（波長）のシグナルの量の損失、別の色の量の増加、ある色と別の色との比率の変化等として表され得る。

【０４４２】

場合によっては、本開示のＣａｓＬポリペプチドは、トランスにＲＮＡを切断することができる。したがって、一部の事例では、標識された検出器核酸は、標識されたＲＮＡである。したがって、標識された検出器ＤＮＡに関する上記の開示は、標識された検出器ＲＮＡにも等しく適用される。場合によっては、標識された検出器ＲＮＡは、修飾糖、修飾塩基、及び修飾骨格のうちの１つ以上を含む。例えば、標識された検出器ＲＮＡは、非天然ヌクレオシド間連結、核酸模倣体、修飾糖部分、修飾核酸塩基、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルホリノ核酸、及びシクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）のうちの１つ以上を含み得る。場合によっては、２つ以上の標識された検出器ＲＮＡが使用される。

【０４４３】

トランスジェニック非ヒト生物

上述したように、場合によっては、本開示の核酸（例えば、組み換え発現ベクター）（例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸等）を導入遺伝子として使用して、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドまたは Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドを生成するトランスジェニック非ヒト生物が作製される。本開示は、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドまたは Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むトランスジェニック非ヒト生物を提供する。

【０４４４】

トランスジェニック非ヒト動物

本開示は、トランスジェニック非ヒト動物を提供し、この動物は、Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドまたは Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物のゲノムは、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドまたは Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。場合によっては、トランスジェニック非ヒト動物は、遺伝子改変に関してホモ接合性である。場合によっては、トランスジェニック非ヒト動物は、遺伝子改変に関してヘテロ接合性である。いくつかの実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物は、脊椎動物、例えば、魚類（例えば、サケ、マス、ゼブラフィッシュ、金魚、フグ、洞窟魚等）、両生類（カエル、イモリ、サンショウウオ等）、鳥類（例えば、ニワトリ、七面鳥等）、爬虫類（例えば、ヘビ、トカゲ等）、非ヒト哺乳動物（例えば、有蹄類、例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等、ウサギ類（例えば、ウサギ）、齧歯類（例えば、ラット、マウス）、非ヒト霊長類等）等である。場合によっては、トランスジェニック非ヒト動物は、無脊椎動物である。場合によっては、トランスジェニック非ヒト動物は、昆虫（例えば、蚊、農業害虫等）である。場合によっては、トランスジェニック非ヒ

ト動物は、クモ類である。

【０４４５】

本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドまたはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、未知のプロモーターの制御下にあり（すなわち、それに作動可能に連結され）得るか（例えば、核酸が宿主細胞ゲノムにランダムに組み込まれる場合）、または既知のプロモーターの制御下にあり（すなわち、それに作動可能に連結され）得る。好適な既知のプロモーターは、任意の既知のプロモーターであり得、構成的に活性なプロモーター（例えば、ＣＭＶプロモーター）、誘導性プロモーター（例えば、ヒートショックプロモーター、テトラサイクリン調節型プロモーター、ステロイド調節型プロモーター、金属調節型プロモーター、エストロゲン受容体調節型プロモーター等）、空間的に制約された及び／または時間的に制約されたプロモーター（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）等を含み得る。

【０４４６】

トランスジェニック植物

上述したように、場合によっては、本開示の核酸（例えば、組み換え発現ベクター）（例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、本開示のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸等）を導入遺伝子として使用して、本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドまたはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドを生成するトランスジェニック植物が作製される。本開示は、本開示のＣａｓ１２ＬポリペプチドまたはＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むトランスジェニック植物を提供する。場合によっては、トランスジェニック植物のゲノムは、対象の核酸を含む。場合によっては、トランスジェニック植物は、遺伝子改変に関してホモ接合性である。場合によっては、トランスジェニック植物は、遺伝子改変に関してヘテロ接合性である。

【０４４７】

外因性核酸を植物細胞に導入する方法は、当該技術分野で周知である。そのような植物細胞は、上記に定義されるように「形質転換された」と見なされる。好適な方法としては、ウイルス感染（二本鎖ＤＮＡウイルス等）、形質移入、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈降、直接マイクロインジェクション、炭化ケイ素ウィスカー技術、アグロバクテリウム媒介型形質転換等が挙げられる。方法の選択は、一般に、形質転換されている細胞の種類、及び形質転換が起こっている状況（すなわち、インビトロ、エクスビボ、またはインビボ）に依存する。

【０４４８】

土壌細菌のアグロバクテリウム・ツメファシエンスに基づく形質転換方法は、外因性核酸分子を維管束植物に導入するために特に有用である。野生型形態のアグロバクテリウムは、宿主植物上での腫瘍原性クラウンゴール増殖の生成を導くＴｉ（腫瘍誘導）プラスミドを含有する。Ｔｉプラスミドの腫瘍誘導Ｔ－ＤＮＡ領域の、植物ゲノムへの移行は、Ｔｉプラスミドでコードされる病毒性遺伝子、ならびに移行される領域の境界を定める一連の直接ＤＮＡリピートであるＴ－ＤＮＡ境界を必要とする。アグロバクテリウム系ベクターは、腫瘍誘導機能が、植物宿主に導入される関心対象の核酸配列によって置き換えられている、改変形態のＴｉプラスミドである。

【０４４９】

アグロバクテリウム媒介型形質転換は、一般に、融合体ベクターまたはバイナリベクター系を用い、ここで、Ｔｉプラスミドの構成要素は、アグロバクテリウム宿主に永続的に常在すると共に病毒性遺伝子を担持するヘルパーベクターと、Ｔ－ＤＮＡ配列によって境界を定められた関心対象の遺伝子を含有するシャトルベクターとに分割される。様々なバイナリベクターが、当該技術分野で周知であり、例えば、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，Ｃａｌｉｆ．）から市販されている。例えば、アグロバクテリウムを、培養植物細胞、または葉組織、根外植片、子葉下部、茎断片もしくは塊茎等の損傷組織と共に共培養する方法もまた、当該技術分野で周知である。例えば、Ｇｌｉｃｋ ａｎｄ Ｔｈｏ

mpson，（eds．），Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology，Boca Raton，Fla．：CRC Press（１９９３）を参照されたい。

【０４５０】

また、マイクロプロジェクタイル媒介型形質転換を使用して、対象のトランスジェニック植物を生成することもできる。Klein et al．（Nature ３２７：７０－７３（１９８７））によって最初に記載されたこの方法は、塩化カルシウム、スペルミジン、またはポリエチレングリコールでの沈降によって所望の核酸分子でコーティングされた、金またはタングステン等のマイクロプロジェクタイルに依存する。マイクロプロジェクタイル粒子は、ＢＩＯＬＩＳＴＩＣ ＰＤ－１０００（Biorad、Hercules Calif．）等のデバイスを使用して、被子植物組織中に高速で加速させられる。

【０４５１】

本開示の核酸（例えば、本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドまたは Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸（例えば、組み換え発現ベクター））は、例えば、インビボまたはエクスビボプロトコルを介して、核酸が植物細胞（複数可）に進入することができるような様態で植物に導入され得る。「インビボ」とは、核酸が植物の生体に投与されること、例えば、浸潤を意味する。「エクスビボ」とは、細胞または外植片が、植物の外側で変更され、次いでそのような細胞または器官が、植物に再生されることを意味する。植物細胞の安定した形質転換またはトランスジェニック植物の樹立に好適ないくつかのベクターが記載されており、これには、Weissbach and Weissbach，（１９８９）Methods for Plant Molecular Biology Academic Press、及びGelvin et al．，（１９９０）Plant Molecular Biology Manual，Kluwer Academic Publishersに記載されるものが含まれる。特定の例としては、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのＴｉプラスミドに由来するもの、ならびにHerrera－Estrella et al．（１９８３）Nature ３０３：２０９、Bevan（１９８４）Nucl Acid Res．１２：８７１１－８７２１、Klee（１９８５）Bio／Technolo ３：６３７－６４２によって開示されるものが挙げられる。代替として、非Ｔｉベクターを使用して、遊離ＤＮＡ送達技法を使用することによって、ＤＮＡを植物及び細胞に移行させることができる。これらの方法を使用することによって、小麦、米（Christou（１９９１）Bio／Technology ９：９５７－９及び４４６２）、及びトウモロコシ（Gordon－Kamm（１９９０）Plant Cell ２：６０３－６１８）等のトランスジェニック植物を生成することができる。未熟な胚もまた、粒子銃を使用することによる直接ＤＮＡ送達技法のため（Weeks et al．（１９９３）Plant Physiol １０２：１０７７－１０８４；Vasil（１９９３）Bio／Technolo １０：６６７－６７４、Wan and Lemeaux（１９９４）Plant Physiol １０４：３７－４８、及びアグロバクテリウム媒介型ＤＮＡ移行のため（Ishida et al．（１９９６）Nature Biotech １４：７４５－７５０）の単子葉植物の良好な標的組織であり得る。ＤＮＡを葉緑体に導入するための例示的な方法は、微粒子銃ボンバードメント、プロトプラストのポリエチレングリコール形質転換、及びマイクロインジェクションである（Danieli et al Nat．Biotechnol １６：３４５－３４８，１９９８、Staub et al Nat．Biotechnol １８：３３３－３３８，２０００、O’Neill et al Plant J．３：７２９－７３８，１９９３、Knoblauch et al Nat．Biotechnol １７：９０６－９０９、米国特許第５，４５１，５１３号、同第５，５４５，８１７号、同第５，５４５，８１８号、及び同第５，５７６，１９８号、国際出願第ＷＯ９５／１６７８３号、ならびにBoynton et al．，Methods in Enzymology ２１７：５１０－５３６（１９

９３）、Ｓｖａｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：９１３－９１７（１９９３）、及びＭｃＢｒｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９１：７３０１－７３０５（１９９４））。微粒子銃ボンバードメント、プロトプラストのポリエチレングリコール形質転換、及びマイクロインジェクションの方法に好適な任意のベクターは、葉緑体形質転換のための標的指向ベクターとして好適である。任意の二本鎖ＤＮＡベクターが、特に導入方法がアグロバクテリウムを利用しない場合、形質転換ベクターとして使用され得る。

【０４５２】

遺伝子改変され得る植物には、穀物、飼料作物、果物、野菜、油料種子作物、ヤシ、森林、及びつる植物が含まれる。改変され得る植物の具体的な例としては、以下、すなわちトウモロコシ、バナナ、ピーナッツ、エンドウマメ、ヒマワリ、トマト、キャノーラ、タバコ、小麦、大麦、オーツ麦、ジャガイモ、大豆、綿、カーネーション、モロコシ、ハウチワマメ、及び米が挙げられる。

【０４５３】

本開示は、形質転換された植物細胞、組織、植物、及び形質転換された植物細胞を含有する生成物を提供する。対象の形質転換細胞、及び組織、ならびにそれらを含む生成物の特徴は、ゲノムに組み込まれた対象の核酸の存在、及び植物細胞による本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドまたはは１２Ｌ融合ポリペプチドの生成である。本発明の組み換え植物細胞は、組み換え細胞の集団として、または組織、種子、全植物、幹、果実、葉、根、花、幹、塊茎、穀物、動物飼料、植物の圃場等として有用である。

【０４５４】

本開示のＣａｓ１２Ｌポリペプチドまたはは１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、未知のプロモーターの制御下にあり（すなわち、それに作動可能に連結され）得るか（例えば、核酸が宿主細胞ゲノムにランダムに組み込まれる場合）、または既知のプロモーターの制御下にあり（すなわち、それに作動可能に連結され）得る。好適な既知のプロモーターは、任意の既知のプロモーターであり得、構成的に活性なプロモーター、誘導性プロモーター、空間的に制約された及び／または時間的に制約されたプロモーター等を含み得る。

【０４５５】

本開示の非限定的な態様の例

上述の本発明の主題の、実施形態を含めた態様は、単独でまたは１つ以上の他の態様もしくは実施形態と組み合わせて有益であり得る。上記の記載を限定することなく、本開示のある特定の非限定的な態様が以下に提供される。本開示を読むと当業者には明らかであるように、個々の番号が付けられた態様の各々は、先行または後続の個々の番号が付けられた態様のうちのいずれかと共に使用され得るか、または組み合わされ得る。これは、態様の全てのそのような組み合わせに対する支持を提供することが意図され、以下に明示的に提供される態様の組み合わせに限定されない。

【０４５６】

態様１．

ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする核酸分子と、

ｂ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、または前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡ分子と

を含む、組成物。

【０４５７】

態様２．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して５０％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様１に記載の組成物。

【０４５８】

態様３．前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、図７、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、

及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに図示される前記ｃｒＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、態様１または態様２に記載の組成物。

【０４５９】

態様４．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、１つ以上の核局在化シグナル（ＮＬＳ）と融合している、態様１または態様２に記載の組成物。

【０４６０】

態様５．脂質を含む、態様１～４のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６１】

態様６．ａ）及びｂ）が、リポソーム内にある、態様１～４のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６２】

態様７．ａ）及びｂ）が、粒子内にある、態様１～４のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６３】

態様８．緩衝液、ヌクレアーゼ阻害剤、及びプロテアーゼ阻害剤のうちの１つ以上を含む、態様１～７のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６４】

態様９．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様１～８のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６５】

態様１０．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、二本鎖標的核酸分子の一方の鎖のみを切断することができるニッカーゼである、態様１～９のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６６】

態様１１．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、触媒的に不活性なＣａｓ１２Ｌポリペプチド（ｄＣａｓ１２Ｌ）である、態様１～９のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６７】

態様１２．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、７００アミノ酸～８００アミノ酸の長さを有する、態様１～１１のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６８】

態様１３．ＤＮＡドナー鋳型をさらに含む、態様１～１２のいずれか１つに記載の組成物。

【０４６９】

態様１４．異種ポリペプチドと融合したＣａｓ１２Ｌポリペプチドを含む、Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７０】

態様１５．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して５０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様１４に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７１】

態様１６．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様１４に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７２】

態様１７．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、二本鎖標的核酸分子の一方の鎖のみを切断することができるニッカーゼである、態様１４～１６のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７３】

態様１８．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、触媒的に不活性なＣａｓ１２Ｌポリペプチド（ｄＣａｓ１２Ｌ）である、態様１４～１７のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７４】

態様１９．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、７００アミノ酸～８００アミノ酸の長さを有する、態様１４～１８のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７５】

態様２０．前記異種ポリペプチドが、前記Ｃａｓ１２ＬポリペプチドのＮ末端及び／またはＣ末端と融合している、態様１４～１９のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７６】

態様２１．核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含む、態様１４～２０のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７７】

態様２２．前記異種ポリペプチドが、標的細胞または標的細胞型上の細胞表面部分への結合を提供する標的指向ポリペプチドである、態様１４～２１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７８】

態様２３．前記異種ポリペプチドが、酵素活性を示す、態様１４～２１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４７９】

態様２４．前記異種ポリペプチドが、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、及びグリコシラーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、態様２３に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４８０】

態様２５．前記異種ポリペプチドが、逆転写酵素活性、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、脱アミノ化活性、脱プリン化活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、及びリコンビナーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、態様２３に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４８１】

態様２６．前記異種ポリペプチドが、標的核酸と会合した標的ポリペプチドを修飾する酵素活性を示す、態様１４～２１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４８２】

態様２７．前記異種ポリペプチドが、ヒストン修飾活性を示す、態様２６に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４８３】

態様２８．前記異種ポリペプチドが、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、脱ミリストイル化活性、グリコシル化活性（例えば、Ｏ－ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼからの）、及び脱グリコシル化活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、態様２６または態様２７に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。

【０４８４】

態様２９．前記異種ポリペプチドが、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、及びデアセチラーゼ活性から選択される１つ以上

の酵素活性を示す、態様２８に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４８５】
態様３０．前記異種ポリペプチドが、エンドソーム脱出ポリペプチドである、態様１４～２１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４８６】
態様３１．前記エンドソーム脱出ポリペプチドが、ＧＬＦＸＡＬＬＸＬＬＸＳＬＷＸＬＬＬＸＡ（配列番号７２）、及びＧＬＦＨＡＬＬＨＬＬＨＳＬＷＨＬＬＬＨＡ（配列番号７３）から選択されるアミノ酸配列を含み、配列中、各Ｘが、独立して、リジン、ヒスチジン、及びアルギニンから選択される、態様３０に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４８７】
態様３２．前記異種ポリペプチドが、葉緑体輸送ペプチドである、態様１４～２１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４８８】
態様３３．前記異種ポリペプチドが、タンパク質形質導入ドメインを含む、態様１４～２１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４８９】
態様３４．前記異種ポリペプチドが、転写を増加または減少させるタンパク質である、態様１４～２１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４９０】
態様３５．前記異種ポリペプチドが、転写リプレッサードメインである、態様３４に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４９１】
態様３６．前記異種ポリペプチドが、転写活性化ドメインである、態様３４に記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４９２】
態様３７．前記異種ポリペプチドが、タンパク質結合ドメインである、態様１４～２１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド。
【０４９３】
態様３８．態様１４～３７のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。
【０４９４】
態様３９．前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、態様３８に記載の核酸。
【０４９５】
態様４０．前記プロモーターが、真核細胞で機能する、態様３９に記載の核酸。
【０４９６】
態様４１．前記プロモーターが、植物細胞、真菌細胞、動物細胞、無脊椎動物の細胞、ハエ細胞、脊椎動物の細胞、哺乳類細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞のうちの１つ以上で機能する、態様４０に記載の核酸。
【０４９７】
態様４２．前記プロモーターが、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、細胞型特異的プロモーター、及び組織特異的プロモーターのうちの１つ以上である、態様３９～４１のいずれか１つに記載の核酸。
【０４９８】
態様４３．組み換え発現ベクターである、態様３８～４２のいずれか１つに記載の核酸。
【０４９９】
態様４４．前記組み換え発現ベクターが、組み換えアデノ随伴ウイルスベクター、組み換えレトロウイルスベクター、または組み換えレンチウイルスベクターである、態様４３

に記載の核酸。
【０５００】
態様４５．前記プロモーターが、原核細胞で機能する、態様３９に記載の核酸。
【０５０１】
態様４６．前記核酸分子が、ｍＲＮＡである、態様３８に記載の核酸。
【０５０２】
態様４７．
（ａ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列と、
（ｂ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と
を含む、１つ以上の核酸。
【０５０３】
態様４８．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して５０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様４７に記載の１つ以上の核酸。
【０５０４】
態様４９．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸に対して８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様４７に記載の１つ以上の核酸。
【０５０５】
態様５０．前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、図７、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに記載されるｃｒＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して８０％以上のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、態様４７～４９のいずれか１つに記載の１つ以上の核酸。
【０５０６】
態様５１．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、１つ以上の核局在化シグナル（ＮＬＳ）と融合している、態様４７～５０のいずれか１つに記載の１つ以上の核酸。
【０５０７】
態様５２．前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする前記ヌクレオチド配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、態様４７～５１のいずれか１つに記載の１つ以上の核酸。
【０５０８】
態様５３．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、プロモーターに作動可能に連結されている、態様４７～５２のいずれか１つに記載の１つ以上の核酸。
【０５０９】
態様５４．前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードする前記ヌクレオチド配列に作動可能に連結されている前記プロモーター、及び／または前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列に作動可能に連結されている前記プロモーターが、真核細胞で機能する、態様５２または態様５３に記載の１つ以上の核酸。
【０５１０】
態様５５．前記プロモーターが、植物細胞、真菌細胞、動物細胞、無脊椎動物の細胞、ハエ細胞、脊椎動物の細胞、哺乳類細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞のうちの１つ以上で機能する、態様５４に記載の１つ以上の核酸。
【０５１１】
態様５６．前記プロモーターが、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、細胞型特異的プロモーター、及び組織特異的プロモーターのうちの１つ以上である、態様５３～５５のいずれか１つに記載の１つ以上の核酸。
【０５１２】
態様５７．１つ以上の組み換え発現ベクターである、態様４７～５６のいずれか１つに記載の１つ以上の核酸。

【０５１３】
態様５８．前記１つ以上の組み換え発現ベクターが、１つ以上のアデノ随伴ウイルスベクター、１つ以上の組み換えレトロウイルスベクター、または１つ以上の組み換えレンチウイルスベクターから選択される、態様５７に記載の１つ以上の核酸。
【０５１４】
態様５９．前記プロモーターが、原核細胞で機能する、態様５３に記載の１つ以上の核酸。
【０５１５】
態様６０．
ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、
ｂ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及び
ｃ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、または前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸
のうちの１つ以上を含む、真核細胞。
【０５１６】
態様６１．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記細胞のゲノムＤＮＡに組み込まれている、態様６０に記載の真核細胞。
【０５１７】
態様６２．植物細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、クモ類細胞、真菌細胞、鳥類細胞、爬虫類細胞、両生類細胞、無脊椎動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、またはヒト細胞である、態様６０または態様６１に記載の真核細胞。
【０５１８】
態様６３．Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むことを含む、細胞。
【０５１９】
態様６４．原核細胞または真核細胞である、態様６３に記載の細胞。
【０５２０】
態様６５．前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む前記核酸を含み、前記核酸分子が、前記細胞のゲノムＤＮＡに組み込まれている、態様６３または態様６４に記載の細胞。
【０５２１】
態様６６．標的核酸を修飾する方法であって、前記方法が、
前記標的核酸を、
ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、及び
ｂ）前記標的核酸の標的配列にハイブリダイズするガイド配列を含むＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ
と接触させる工程
を含み、
前記接触させる工程が、前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドによる前記標的核酸の修飾をもたらす、
前記方法。
【０５２２】
態様６７．前記修飾が、前記標的核酸の切断である、態様６６に記載の方法。
【０５２３】
態様６８．前記標的核酸が、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、ＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、及び染色体外ＤＮＡから選択される、態様６６または態様６７に記載の方法。
【０５２４】
態様６９．前記接触させる工程が、細胞の外部でインビトロで起こる、態様６６～６８

のいずれか１つに記載の方法。
【０５２５】
態様７０．前記接触させる工程が、培養中の細胞の内部で起こる、態様６６～６８のいずれか１つに記載の方法。
【０５２６】
態様７１．前記接触させる工程が、インビボで細胞の内部で起こる、態様６６～６８のいずれか１つに記載の方法。
【０５２７】
態様７２．前記細胞が、真核細胞である、態様７０または態様７１に記載の方法。
【０５２８】
態様７３．前記細胞が、植物細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、爬虫類細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、魚類細胞、寄生虫細胞、節足動物細胞、無脊椎動物の細胞、脊椎動物の細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞から選択される、態様７２に記載の方法。
【０５２９】
態様７４．前記細胞が、原核細胞である、態様７０または態様７１に記載の方法。
【０５３０】
態様７５．前記接触させる工程が、ゲノム編集をもたらす、態様６６～７４のいずれか１つに記載の方法。
【０５３１】
態様７６．前記接触させる工程が、細胞に、（ａ）前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及び（ｂ）前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、または前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を導入することを含む、態様６６～７５のいずれか１つに記載の方法。
【０５３２】
態様７７．前記接触させる工程が、ＤＮＡドナー鋳型を前記細胞に導入することをさらに含む、態様７６に記載の方法。
【０５３３】
態様７８．前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、図７、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに記載されるｃｒＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して８０％以上のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、態様６６～７７のいずれか１つに記載の方法。
【０５３４】
態様７９．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、核局在化シグナルと融合している、態様６６～７８のいずれか１つに記載の方法。
【０５３５】
態様８０．標的ＤＮＡからの転写を調節する方法、標的核酸を修飾する方法、または標的核酸と会合したタンパク質を修飾する方法であって、
前記標的核酸を、
ａ）異種ポリペプチドと融合したＣａｓ１２Ｌポリペプチドを含むＣａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、及び
ｂ）前記標的核酸の標的配列にハイブリダイズするガイド配列を含むＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ
と接触させる工程
を含む、前記方法。
【０５３６】
態様８１．前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡが、図７、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦに記載されるｃｒＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して８０％以上のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、態様８０に記載

の方法。
【０５３７】
態様８２．前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドが、核局在化シグナルを含む、態様８０または態様８１に記載の方法。
【０５３８】
態様８３．前記修飾が、前記標的核酸の切断ではない、態様８０～８２のいずれか１つに記載の方法。
【０５３９】
態様８４．前記標的核酸が、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、ＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、及び染色体外ＤＮＡから選択される、態様８０～８３のいずれか１つに記載の方法。
【０５４０】
態様８５．前記接触させる工程が、細胞の外部でインビトロで起こる、態様８０～８４のいずれか１つに記載の方法。
【０５４１】
態様８６．前記接触させる工程が、培養中の細胞の内部で起こる、態様８０～８４のいずれか１つに記載の方法。
【０５４２】
態様８７．前記接触させる工程が、インビボで細胞の内部で起こる、態様８０～８４のいずれか１つに記載の方法。
【０５４３】
態様８８．前記細胞が、真核細胞である、態様８６または態様８７に記載の方法。
【０５４４】
態様８９．前記細胞が、植物細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、爬虫類細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、魚類細胞、寄生虫細胞、節足動物細胞、無脊椎動物の細胞、脊椎動物の細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、霊長類細胞、非ヒト霊長類細胞、及びヒト細胞から選択される、態様８８に記載の方法。
【０５４５】
態様９０．前記細胞が、原核細胞である、態様８６または態様８７に記載の方法。
【０５４６】
態様９１．前記接触させる工程が、細胞に、（ａ）前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、または前記Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸、及び（ｂ）前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、または前記Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を導入することを含む、態様８０～９０のいずれか１つに記載の方法。
【０５４７】
態様９２．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、触媒的に不活性なＣａｓ１２Ｌポリペプチド（ｄＣａｓ１２Ｌ）である、態様８０～９１のいずれか１つに記載の方法。
【０５４８】
態様９３．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、７００アミノ酸～８００アミノ酸の長さを有する、態様８０～９２のいずれか１つに記載の方法。
【０５４９】
態様９４．前記異種ポリペプチドが、酵素活性を示す、態様８０～９３のいずれか１つに記載の方法。
【０５５０】
態様９５．前記異種ポリペプチドが、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、及びグリコシラーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、態様９４に記載の方法。

【０５５１】
態様９６．前記異種ポリペプチドが、逆転写酵素活性、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、脱アミノ化活性、脱プリン化活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、及びリコンビナーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、態様９４に記載の方法。
【０５５２】
態様９７．前記異種ポリペプチドが、標的核酸と会合した標的ポリペプチドを修飾する酵素活性を示す、態様８０～９３のいずれか１つに記載の方法。
【０５５３】
態様９８．前記異種ポリペプチドが、ヒストン修飾活性を示す、態様９７に記載の方法。
【０５５４】
態様９９．前記異種ポリペプチドが、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、脱ミリストイル化活性、グリコシル化活性（例えば、Ｏ－ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼからの）、及び脱グリコシル化活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、態様９７または態様９８に記載の方法。
【０５５５】
態様１００．前記異種ポリペプチドが、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、及びデアセチラーゼ活性から選択される１つ以上の酵素活性を示す、態様９９に記載の方法。
【０５５６】
態様１０１．前記異種ポリペプチドが、転写を増加または減少させるタンパク質である、態様８０～９３のいずれか１つに記載の方法。
【０５５７】
態様１０２．前記異種ポリペプチドが、転写リプレッサードメインである、態様１０１に記載の方法。
【０５５８】
態様１０３．前記異種ポリペプチドが、転写活性化ドメインである、態様１０１に記載の方法。
【０５５９】
態様１０４．前記異種ポリペプチドが、タンパク質結合ドメインである、態様８０～９３のいずれか１つに記載の方法。
【０５６０】
態様１０５．トランスジェニック多細胞非ヒト生物であって、そのゲノムが、
ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、
ｂ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、及び
ｃ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ
のうちの１つ以上をコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、前記トランスジェニック多細胞非ヒト生物。
【０５６１】
態様１０６．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸配列に対して５０％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様１０５に記載のトランスジェニック多細胞非ヒト生物。
【０５６２】
態様１０７．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸配列に対して８５％

以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様１０５に記載のトランスジェニック多細胞非ヒト生物。

【０５６３】

態様１０８．前記生物が、植物、単子葉植物、双子葉植物、無脊椎動物、昆虫、節足動物、クモ類、寄生虫、蠕虫、刺胞動物、脊椎動物、魚類、爬虫類、両生類、有蹄類、鳥類、ブタ、ウマ、ヒツジ、齧歯類、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である、態様１０５～１０７のいずれか１つに記載のトランスジェニック多細胞非ヒト生物。

【０５６４】

態様１０９．

ａ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、

ｂ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＤＮＡドナー鋳型、

ｃ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、

ｄ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチド、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＤＮＡドナー鋳型、

ｅ）Ｃａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、

ｆ）Ｃａｓ１２ＬポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＤＮＡドナー鋳型、

ｇ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、及びＣａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、

ｈ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡ、及びＤＮＡドナー鋳型、

ｉ）ｉ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列とを含む、１つ以上の組み換え発現ベクター、

ｊ）ｉ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉｉ）ＤＮＡドナー鋳型とを含む、１つ以上の組み換え発現ベクター、

ｋ）ｉ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列とを含む、１つ以上の組み換え発現ベクター、ならびに

ｌ）ｉ）Ｃａｓ１２Ｌ融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ｉｉ）Ｃａｓ１２ＬガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列と、ＤＮＡドナー鋳型とを含む、１つ以上の組み換え発現ベクター

を含む、システム。

【０５６５】

態様１１０．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して５０％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様１０９に記載のＣａｓ１２Ｌシステム。

【０５６６】

態様１１１．前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドが、図２Ａ～２Ｚ、図２ＡＡ～２ＺＺ、及び図２ＡＡＡ～２ＦＦＦのうちのいずれか１つに図示されるアミノ酸配列に対して８５％以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様１０９に記載のＣａｓ１２Ｌシステム。

【０５６７】

態様１１２．前記ドナー鋳型核酸が、８ヌクレオチド～１０００ヌクレオチドの長さを有する、態様１０９～１１１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌシステム。

【０５６８】

態様１１３．前記ドナー鋳型核酸が、２５ヌクレオチド～５００ヌクレオチドの長さを

有する、態様１０９～１１１のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌシステム。
【０５６９】
態様１１４．態様１０９～１１３のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌシステムを含む、キット。
【０５７０】
態様１１５．前記キットの構成要素が、同じ容器中にある、態様１１４に記載のキット。
【０５７１】
態様１１６．前記キットの構成要素が、別個の容器中にある、態様１１４に記載のキット。
【０５７２】
態様１１７．態様１０９～１１６のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌシステムを含む、滅菌容器。
【０５７３】
態様１１８．前記容器が、シリンジである、態様１１７に記載の滅菌容器。
【０５７４】
態様１１９．態様１０９～１１６のいずれか１つに記載のＣａｓ１２Ｌシステムを含む、埋め込み型デバイス。
【０５７５】
態様１２０．前記Ｃａｓ１２Ｌシステムが、マトリックス内にある、態様１１９に記載の埋め込み型デバイス。
【０５７６】
態様１２１．前記Ｃａｓ１２Ｌシステムが、リザーバ中にある、態様１１９に記載の埋め込み型デバイス。
【０５７７】
態様１２２．試料中の標的ＤＮＡを検出する方法であって、
（ａ）前記試料を、
（ｉ）Ｃａｓ１２Ｌポリペプチド、
（ｉｉ）前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドに結合する領域と、前記標的ＤＮＡとハイブリダイズするガイド配列とを含む、ガイドＲＮＡ、及び
（ｉｉｉ）一本鎖であり、かつ前記ガイドＲＮＡの前記ガイド配列とハイブリダイズしない、検出器核酸
と接触させる工程と、
（ｂ）前記Ｃａｓ１２Ｌポリペプチドによる前記一本鎖検出器核酸の切断によって生成される検出可能なシグナルを測定する工程であって、それにより、前記標的ＤＮＡを検出する、測定する工程と、
を含む、前記方法。
【０５７８】
態様１２３．前記標的ＤＮＡが、細菌ＤＮＡである、態様１２２に記載の方法。
【０５７９】
態様１２４．前記標的ＤＮＡが、ウイルスＤＮＡである、態様１２２に記載の方法。
【０５８０】
態様１２５．前記標的ＤＮＡが、パポバウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヘパドナウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、またはパルボウイルスＤＮＡである、態様１２４に記載の方法。
【０５８１】
態様１２６．前記標的ＤＮＡが、ヒト細胞由来である、態様１２２に記載の方法。
【０５８２】

態様１２７．前記標的ＤＮＡが、ヒト胎児ＤＮＡまたはがん細胞ＤＮＡである、態様１２２に記載の方法。

【０５８３】

態様１２８．前記試料が、細胞溶解物を含む、態様１２２に記載の方法。

【０５８４】

態様１２９．前記試料が、細胞を含む、態様１２２に記載の方法。

【０５８５】

態様１３０．前記試料が、血液、血清、血漿、尿、吸引液、または生検試料である、態様１２２に記載の方法。

【０５８６】

態様１３１．前記試料中に存在する前記標的ＤＮＡの量を決定する工程をさらに含む、態様１２２～１３０のいずれか１つに記載の方法。

【０５８７】

態様１３２．検出可能なシグナルの前記測定が、視覚ベースの検出、センサーベースの検出、色検出、金ナノ粒子ベースの検出、蛍光偏光、コロイド相転移／分散、電気化学検出、及び半導体ベースの感知のうちの１つ以上を含む、態様１３１に記載の方法。

【０５８８】

態様１３３．前記標識された検出器核酸が、ＤＮＡである、態様１２２～１３２のいずれか１つに記載の方法。

【０５８９】

態様１３４．前記標識された検出器核酸が、ＲＮＡである、態様１２２～１３２のいずれか１つに記載の方法。

【０５９０】

態様１３５．前記標識された検出器核酸が、修飾核酸塩基、修飾糖部分、及び／または修飾核酸連結を含む、態様１２２～１３４のいずれか１つに記載の方法。

【０５９１】

態様１３６．前記検出可能なシグナルが、４５分未満で検出可能である、態様１２２～１３５のいずれか１つに記載の方法。

【０５９２】

態様１３７．前記検出可能なシグナルが、３０分未満で検出可能である、態様１２２～１３５のいずれか１つに記載の方法。

【０５９３】

態様１３８．ループ介在等温増幅（ＬＡＭＰ）、ヘリカーゼ依存型増幅（ＨＤＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、核酸配列ベースの増幅（ＮＡＳＢＡ）、転写媒介増幅（ＴＭＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、複数置換増幅（ＭＤＡ）、分岐（ＲＡＭ）、環状ヘリカーゼ依存型増幅（ｃＨＤＡ）、単一プライマー等温増幅（ＳＰＩＡ）、ＲＮＡ技術のシグナル媒介増幅（ＳＭＡＲＴ）、自家持続配列複製（３ＳＲ）、ゲノムの指数的増幅反応（ＧＥＡＲ）、または等温複数置換増幅（ＩＭＤＡ）により、前記試料中の前記標的ＤＮＡを増幅する工程をさらに含む、態様１２２～１３７のいずれか１つに記載の方法。

【０５９４】

態様１３９．前記試料中の標的ＤＮＡが、１０ａＭ未満の濃度で存在する、態様１２２～１３８のいずれか１つに記載の方法。

【０５９５】

態様１４０．前記標識された検出器核酸の前記標識が、蛍光発光色素対を含む、態様１２２～１３９のいずれか１つに記載の方法。

【０５９６】

態様１４１．前記蛍光発光色素対が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対である、態様１４０に記載の方法。

【０５９７】

態様１４２．前記蛍光発光色素対が、クエンチャー／蛍光体対である、態様１４０に記載の方法。

【０５９８】

態様１４３．前記標識された検出器核酸が、２つ以上の蛍光発光色素対を含む、態様１４２～１４７のいずれか１つに記載の方法。

【０５９９】

態様１４４．前記２つ以上の蛍光発光色素対が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）対及びクエンチャー／蛍光体対を含む、態様１４３に記載の方法。

【実施例】

【０６００】

以下の実施例は、当業者に本発明の作製及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するように提示されており、本発明者らが本発明と見なすものの範囲を限定することを意図するものでも、下記の実験が実施した全てまたは唯一の実験であることを表すことを意図するものでもない。使用される数値（例えば、量、温度等）に関して正確さを保証する努力がなされたが、いくらかの実験誤差及び偏差が考慮されるべきである。別途指示されない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧またはほぼ大気圧である。標準的な略語が使用され得、例えば、ｂｐは塩基対（複数可）、ｋｂはキロベース（複数可）、ｐｌはピコリットル（複数可）、ｓまたはｓｅｃは秒（複数可）、ｍｉｎは分（複数可）、ｈまたはｈｒは時間（複数可）、ａａはアミノ酸（複数可）、ｋｂはキロベース（複数可）、ｂｐは塩基対（複数可）、ｎｔはヌクレオチド（複数可）、ｉ．ｍ．は筋肉内（に）、ｉ．ｐ．は腹腔内（に）、ｓ．ｃは皮下（に）等である。

【０６０１】

実施例１：Ｃａｓλ１は、ＴＴＲ　ＰＡＭを有する二本鎖ＤＮＡを切断する

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクター複合体は、宿主ＤＮＡのＣＲＩＳＰＲアレイの自己標的指向化を防止するように、ＤＮＡ干渉前に、外来ＤＮＡ上にのみ存在する短いプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を認識する。ＣａｓλがＲＮＡ誘導ＤＮＡ標的指向エンドヌクレアーゼであるかどうかを実験的に試験するために、及びＤＮＡ特定にＰＡＭが必要とされるかどうかを試験するために、ＣａｓλファミリーのＣａｓλ１タンパク質ホモログを用いて大腸菌においてＰＡＭ除去アッセイをセットアップした。ＰＡＭ除去アッセイにおいて、Ｃａｓλは、任意の天然ＣａｓλのＣＲＩＳＰＲアレイに見出されるいずれの配列とも明確に異なる、プラスミドライブラリーにおけるランダム化された配列に隣接したＤＮＡ配列を標的とする。ＮＧＳシーケンシングにより、Ｃａｓλ及びｃｒＲＮＡ（ｐＢＡＳ１８から発現されるようなもの、図１１）は、提示されるようなＰＡＭ配列がプロトスペーサーに隣接する場合（図９）、標的プラスミドに対して相補性を有しない非標的指向対照ガイドＲＮＡ（ｐＢＡＳ１２から発現されるようなもの、図１０）と対合されたＣａｓλと比較して、細菌においてｃｒＲＮＡガイドに相補的なＤＮＡ部位を有するプラスミドを除去するのに十分であることが明らかとなった。結果は、ＰＡＭが標的の５’末端上に存在する（例えば、Ｃａｓλ１の場合はＴリッチＰＡＭ）、ガイドＲＮＡに相補的であるＤＮＡの任意の配列を切断するように、Ｃａｓλが再プログラムされ得、インビボでの機能的エフェクターの形成のために追加のＲＮＡ構成要素は必要とされないことを示した。

【０６０２】

実施例２：プログラム可能なＤＮＡ標的指向化

ゲノムに組み込まれたＧＦＰ及びＲＦＰ発現カセットを含有する大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株からカナマイシン耐性カセットを排除するために、大腸菌においてｆｌｐ組み換えアッセイを実施した。大腸菌ΔＫａｎの個々のコロニーを採取し、３つの５ｍＬ（ＬＢ）の種培地に植菌して、翌日、エレクトロコンピテント細胞を調製した。種培地から１００ｍＬ（ＬＢ）の本培地に植菌し、それを３７℃で激しく振とうしながら０．６～０．７のＯＤ６００まで増殖させてから、氷冷Ｈ２０及び１０％グリセロールで繰り返し洗浄するこ

とによってエレクトロコンピテント細胞を調製した。細胞を１０％グリセロール中に再懸濁させ、５０μＬのアリコートを液体窒素中で急速凍結し、－８０℃で保管した。

【０６０３】

コドン最適化されたＣａｓλ１遺伝子と、その同種リピートエレメント、及び結果として生じた大腸菌ΔＫａｎ株内のＧＦＰ　ＤＮＡを標的とする選択されたスペーサーで構成されるガイド（ｐＢＡＳ４１、ｐＢＡＳ４２、ｐＢＡＳ４３、ｐＢＡＳ４４）とを含有するＣａｓλベクターを作製し、ｐＢＡＳ１２からサブクローニングした。Ｃａｓλ１と、Ｃａｓλ２からの非同種リピート単位及びＧＦＰ標的指向スペーサー（ＴＡＧＣＡＴＣＡＣＣＴＴＣＡＣＣＣＴＣＴＣＣＡＣＧＧＡＣＡＧ、配列番号１６５）ガイドで構成されるガイドとを含有するＣａｓλベクターもまたサブクローニングして、ｐＢＡＳ４０を形成させた。Ｃａｓλベクター、及び、非標的指向ガイド対照プラスミドを有するＣａｓλベクターにより、Ｍｉｃｒｏｐｕｌｓｅｒエレクトロポレーター（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で、０．１ｍｍエレクトロポレーションキュベット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）中、エレクトロポレーションを介した１００ｎｇのプラスミドによる２５μＬのエレクトロコンピテント細胞の形質転換を行い、細胞を、３７℃で１時間振とうしながら１ｍＬの回収培地（Ｌｕｃｉｇｅｎ）中に回収した。次いで、１０倍希釈系列を調製し、３．５μＬのそれぞれの希釈液を、適切な抗生物質及びＩＰＴＧ誘導剤を含有するＬＢ－寒天上にスポットプレーティングした。プレートを３７℃で一晩インキュベートし、翌日にコロニーを計数して、形質転換効率を決定した。

【０６０４】

形質転換効率を評価するために、エレクトロポレーションのトリプリケートについて形質転換プラスミド１ｎｇ当たりの細胞形成単位から平均値及び標準偏差を計算した。

【０６０５】

データが図１２Ａ～１２Ｃに示される。この実験は、非標的指向対照と比較して、それらの同種ガイド（ｐＢＡＳ４４）を伴うＣａｓλベクターを使用した場合のＧＦＰ大腸菌の顕著な減少を示し、このことは標的領域での二本鎖ＤＮＡ切断を示すものであった。青色光下での主としてＲＦＰ陽性／ＧＦＰ陰性のコロニーの増殖は、ＧＦＰ生成を欠いた染色をもたらすような標的とされたプログラム可能なゲノム編集を付与する能力をさらに裏付ける。別個のＣａｓλオルソログ由来のガイド（ｐＢＡＳ４０）を伴うＣａｓλベクターを使用した増殖阻害（観察されたコロニーが主としてＲＦＰを発現し、ＧＦＰを発現しない）もまた、Ｃａｓλオルソログが、関連するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム由来のガイドを使用して、ＧＦＰ生成の正確な除去を伴って細胞における編集を付与するように機能し得ることを示す。これは、哺乳類細胞における活性を示す、ＧＦＰが組み込まれたＨＥＫ２９３Ｔ哺乳類細胞にさらに拡張することができる。両方の実例において（さらには未希釈の試料中であっても）増殖させた大腸菌コロニーの病弱表現型（ｓｉｃｋｌｙ　ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ）もまた、核酸（ＲＮＡまたはＤＮＡ）のトランス切断の可能性を示すものであり、これは、標的核酸を含有する試料に、Ｃａｓλ　ＲＮＰ、及び標的核酸の不在下での顕著により低い蛍光シグナルと比較して標的核酸の存在下で強力な蛍光シグナルを発する一本鎖ＤＮＡフルオロフォア－クエンチャー（ｓｓＤＮＡ－ＦＱ）レポーターまたはＲＮＡフルオロフォア－クエンチャー（ｓｓＲＮＡ－ＦＱ）レポーター分子を提供することによって、診断目的で使用することができる。

【０６０６】

ｐＢＡＳ４４及びｐＢＡＳ４０スペーサー：ＴＡＧＣＡＴＣＡＣＣＴＴＣＡＣＣＣＴＣＴＣＣＡＣＧＧＡＣＡＧ（配列番号１６５）。

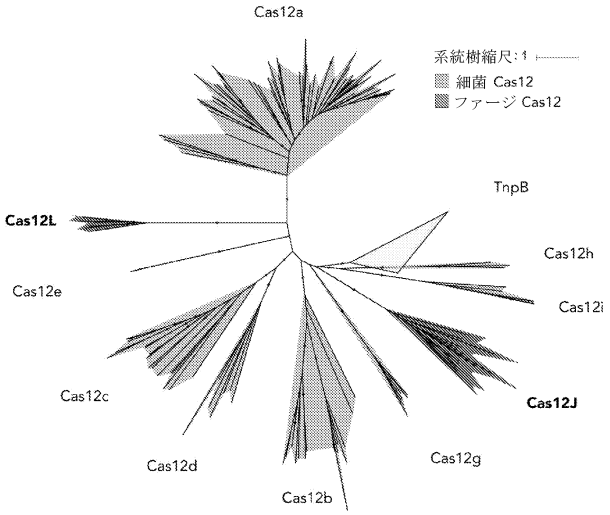
【０６０７】

図１２Ａ～１２Ｃ。ＧＦＰ標的指向ガイド（ｐＢＡＳ４４）を伴うＣａｓλは、非標的指向ガイド（ｐＢＡＳ１２）を伴うＣａｓλの陰性対照と比較して、コロニー形成単位（細胞生存率の代理として）における複数桁の低減を示した。別のオルソログ由来のリピート単位を使用したＧＦＰ標的指向ガイドを伴うＣａｓλもまた、ＧＦＰの阻害された増殖及び除去を示した。

【０６０８】
実施例３：Ｃａｓλ精製
Ｃａｓλの精製により、計算により予測された値である約７０～８５ｋＤａと一致したタンパク質サイズが示された。Ｈｉｓタグを含有するＣａｓλ過剰発現ベクターにより、化学的にコンピテントな大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）－Ｓｔａｒ（ＱＢ３－Ｍａｃｒｏｌａｂ，ＵＣ　Ｂｅｒｋｅｌｅｙ）の形質転換を行い、ＬＢ－Ｋａｎ寒天プレート（５０μｇ／ｍＬのカナマイシン）上、３７℃で一晩インキュベートした。単一コロニーを採取して、５０ｍＬ（ＬＢ、カナマイシン５０μｇ／ｍＬ）の種培地に植菌し、これらを激しく振とうしながら３７℃で一晩インキュベートした。翌日、２つの７５０ｍＬのＴＢ－Ｋａｎ培地（５０μｇ／ｍＬのカナマイシン）に４０ｍＬの種培地を植菌し、３７℃で０．６のＯＤ６００まで増殖させ、氷上で冷却し、その後、０．５ｍＭのＩＰＴＧで遺伝子発現を誘導し、続いて１６℃で一晩インキュベートした。
【０６０９】
細胞を遠心分離によって採取し、低塩緩衝液中に再懸濁させ、次いで、その後、超音波処理によって溶解させた。可溶性画分を、洗浄緩衝液中で予備平衡化した５ｍＬのＮｉ－ＮＴＡ　Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗカートリッジ（Ｑｉａｇｅｎ）に負荷した。結合したタンパク質を２０カラム体積（ＣＶ）の洗浄緩衝液で洗浄し、その後、５ＣＶの溶出緩衝液（５０ｍＭのＨＥＰＥＳ－Ｎａ（ｐＨ７．５）、室温、５００ｍＭのＮａＣｌ、５００ｍＭのイミダゾール、５％グリセロール、及び０．５ｍＭのＴＣＥＰ）中で溶出させた。溶出したタンパク質を１ｍＬに濃縮してから、サイズ排除クロマトグラフィー緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ－Ｎａ（ｐＨ７．５）、室温、５００ｍＭのＮａＣｌ、５％グリセロール、及び０．５ｍＭのＴＣＥＰ）中で予備平衡化したＨｉＬｏａｄ　１６／６００　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００ｐｇカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に注入した。ピーク画分を１ｍＬに濃縮し、ＮａｎｏＤｒｏｐ　８０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して濃度を決定した。タンパク質を４℃の一定温度で精製し、凝集を防止するために濃縮タンパク質を氷上で維持し、液体窒素中で急速凍結し、－８０℃で保管した。
【０６１０】
タンパク質精製の様々な段階でのＣａｓλのドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により、計算により予測された値である約７０ｋＤａと一致したタンパク質サイズが示された。
【０６１１】
本発明はその具体的な実施形態を参照して記載されたが、本発明の真の主旨及び範囲から逸脱することなく様々な変更が行われてもよく、均等物に置き換えられてもよいことが当業者には理解されるはずである。加えて、特定の状況、材料、組成物、プロセス、プロセスのステップ（単数または複数）を本発明の目的、主旨、及び範囲に適応させるために、多くの変更がなされてもよい。そのような変更は全て、本明細書に添付される特許請求の範囲内にあることが意図される。

【図面】

【図１】



【図２Ａ】

>Cas12L_1_257905508 (配列番号 102)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKISELYKYIPNEKKN
SGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRRFGYVASAISN
YVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLY
EFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVF
GRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILD
DGNVKGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMQYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSF
SDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKG
IEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMVSLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQE
EMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSAKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAG
VSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTDCRN
MFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｂ】

>Cas12L_2_196848753 (配列番号 103)

MAHKKNVGAEIVKTYSFKVKNTNGITMEKLMNAIDEFQSYYNLCSDWICKNLTTMTIGDLDQYIP
EKAKGNTYATVLLDEAWKNQPLYKIFGKKYSSNNRNNALYCALSSVIDMTKENVLGFSKTHYIR
NDYILNVISNYASKLSKLNTGVKSRAIKETSDEATIIEQVIYEMEHNKWESIEDWKNQIEYLNSKT
DYNPTYMERMKTLSAYYSTHKSEVDAKMQEMAVENLVKFGGCRRNNSKKSMFIMGSNTTNYT
ISYIGGNSFNINFANILNFDVYGRRDVVKNGEVLVDIMANHGDSIVLKIVNGELYADVPCSVTLNK
VESNFDKVVGIDVNMKHMLLSTSITDNGSSDFLNIYKEMSNNAEFMALCPEEDRKYYKDISKYV
TFAPLELDLLFSRISKQGKVKMEKVYSEILEALKWKFFANGDNKNRIYVESIQKIRQQIKALCVIK
NAYYEQQSAYDIDKTQEYIETHPFSLTEKGMSIKSKMDKICQTIIGCRNNIIDYAYSFFERNGYSII
GLEKLTSSQFEKTKSMPTCKSLLNFHKVLGHTLSELETLPINDVVKKGYYTFTTDNEGKITDASL
SEKGKVRKMKDDFFNQAIKAIHFADVKDYFATLSNNGQTGIFFVPSQFTSQMDSNTHNLYFENA
KNGGLKLAPKYKVRQTQEYHLNGLPADYNAARNIAYIGLDETMRNTFLKKANSNKSLYNQPIYD
TGIKKTAGVFSRMKKLKRYEII*

リピート: ATTGTTGTAGACCTCTTTTTTATAAGGATTGAACAAC (配列番号 3)
スペーサー長: 30

【図２Ｃ】

>Cas12L_3_66741167 (配列番号 104)

MRISPHLFYIFFKKIWKCHFFVLSLYQLNQYIMASHEKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAI
TEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANN
RDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRRFGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVD
TIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMET
MSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTL
LVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNI
YKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVL
NKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTD
KGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILG
CTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITL
SNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAA
RNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｄ】

>Cas12L_4_67031163 (配列番号 105)
MRISPHLFYIFFKKIWKSHFFVLSLYQLNQYIMASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAI
TEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANN
RDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFPDTYYRRFGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVD
TIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMET
MSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTL
LVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNI
YKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVL
NKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTD
KGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKNPFPTVNSLLKYHKILG
CTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITL
SNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAA
RNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｅ】

>Cas12L_5_67793351 (配列番号 106)
MRISPHLFYIFFKKIWKCHIFVLSLYQLNQYIMASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAIT
EYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNR
DNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRRFGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTI
MEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMS
IDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVD
IINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYK
EVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNK
LKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGI
EILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQ
EEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNN
GTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIA
YIMENTDCRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｆ】

>Cas12L_6_67912869_部分 (配列番号 107)
QYVTFAPLELDLLFSRISKQGKVKMEKAYSEILEALKWKFFANGDNKNRIYVESIQKIRQQIKALC
VIKNAYYEQQSAYDIDKTQEYIETHPFSLTEKGMSIKSKMDKICQTIIGCRNNIIDYAYSFFERNGY
TIIGLEKLTSSQFEKTKSMPTCKSLLNFHKVLGHTLSELETLPINDVVKKGYYAFTTDNEGRITDA
SLSEKGKVRKMKDDFFNQAIKAIHFADVKDYFATLSNNGQTGIFFVPSQFTSQMDSNTHNLYFE
NAKNGGLKLASKSKVRKSQEYHLNGLPADYNAARNIAYIGLDEIMRNTFLKKANSNKSLYNQPI
YDTGIKKTAGVFSRMKKLKKYKVI*

リピート: ATTGTTGTAGATACCTTTTTGTAAGGATTGAACAAC (配列番号 5)
スペーサー長: 30

【図２Ｇ】

>Cas12L_7_68090316_部分 (配列番号 108)
VLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKK
GYPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRRFGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNIS
NDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEV
NSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYD
VIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGN
VNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAME
KSFSNVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQE
HPFSNTDKGIEILHKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLL
KYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADI
KDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLN
ADYNAARNIAYIMENTDCRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFMKILDEA
SV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｈ】

>Cas12L_8_68328292_部分 (配列番号 109)
IFFKKIWKCHIFVLSLYQLNQYIMASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNIC
SDWIKDHLTMKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANSRDNAIYEALN
TCNTEHYTGNILNFSDTYYRRFGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEM
EHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGG
CRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIDGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGAS
FVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDF
KKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIET
GDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILHKLDNI
SKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDI
YSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLV
PSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTEQ
GSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｉ】

>Cas12L_9_68454124 (配列番号 110)
MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSAKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVSKLKKDGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｊ】

>Cas12L_10_68605313 (配列番号 111)
MMKKMRTNPHLFYICFKKIWKCHFFALSLYQLNQYIMASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLD
VLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKK
GYPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRRFGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNIS
NDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEV
NSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYD
VIKDNTLLVDIINEHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGN
VNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAME
KSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQE
HPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLL
KYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADI
KDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLN
ADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEA
SA*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｋ】

>Cas12L_11_69266821_部分 (配列番号 112)
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｌ】

>Cas12L_12_69417229_部分 (配列番号 112)
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｍ】

>Cas12L_13_69733214 (配列番号 113)
MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFEKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTDCRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｎ】

>Cas12L_14_70235246_部分 (配列番号 114)
VPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTD
FSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKL
RSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYS
YNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKSFPTVDSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDN
DVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHK
IYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTDCRNMFMKQSRTDKS
LYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｏ】

>Cas12L_15_70724743 (配列番号 115)
MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｐ】

>Cas12L_16_70731038 (配列番号 **116**)

MAHKKNIGAEIVKTYSFKVKNTNGITMEKLMNAIDEYQSYYNLCSDWICKNLTTMTIGDLDRYIP
EKAKDNIYATVLLDEVWKNQPLYKIFGKKYSSNNRINALYCTLSSVIDINKKNILGLSQTYYARNG
YILNVISNYASKLSKLNTGVKRHTIKETSDEATIVEQVIYEMEHNKWESIEDWKNQIEYLNSKTDY
NPTYMERMKTLSAYYSEHKSEVDAKMQEMAVENLVKFGGCRRNNSKKSMFIMGSSKTTYTIS
YIGDNCFNINFANILNFDVYGRRDVVKNGEVLVDIMANHGDSIVLKIVNGELYADVPCSTTLNKV
ESTFDKVAGIDVNMKHMLLSTSVTDNGNSDFVNIYKEMSNNAEFMALCPEEDRKYYKDISQYV
TFAPLELDLLFSRISKQGKVKMEKAYSEILEALKWKFFANGDNKNRIYVENIQKIRQQIKALCVIK
NAYYEQQSAYDIDKTQEYIEAHPFSLTEKGMSIKSKMDNICRTIIGCRNNIIDYAYSFFERNDYSII
GLEKLTSSQFEKTKSLPTCKSLLNFHKVLGHTLSELETLPINDVVKKGYYTFTTDNEGRITDASL
SEKGKVRKMKDDFFNQAIKAIHFADVKDYFATLSNNGQTGIFFVPSQFTSQMDSNTHTLYFENA
KNGGLKLASKYKVRKSQEYHLNGLPADYNAARNIAYIGLDEIMRNTFLKKANSNKSLYNQPIYDT
GIKKTAGVFSRMKKLKKYKVI*

リピート: TATTGTTGTAGATACCTTTTTGTAAGGATTAAACAAC (配列番号 7)
スペーサー長: 30

【図２Ｑ】

>Cas12L_17_70959391 (配列番号 **117**)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMQYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKIIDEASV*

【図２Ｒ】

>Cas12L_18_71078086 (配列番号 **118**)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMQYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNGVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｓ】

>Cas12L_19_71193509_部分 (配列番号 **119**)

EKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYR
RFGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYL
ESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTP
FDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINEHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKK
IATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVT
FCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMK
AYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEI
NGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTD
AKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTVGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQ
DNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENNECRNMFMKQSRTDKSLYNKP
SYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｔ】

>Cas12L_20_71210958_部分 (配列番号 **120**)

DAKMQEMAVENLVKFGGCRRNNSKKSMFIMGSSKTTYTISYIGDNCFNINFANILNFDVYGRRD
VVKNGEVLVDIMANHGDSIVLKIVNGELYADVPCSTTLNKVESTFDKVAGIDVNMKHMLLSTSVT
DNGNSDFVNIYKEISNNAEFMALCPEEDRKYYKDISQYVTFAPLELDLLFSRISKQGKVKMEKAY
SEILETLKWKFFANGDNKNRIYVESIQKIRQQIKALCVIKNAYYEQQSAYDIDKTQEYIEAHPFSLT
EKGMSIKSKMDNICRTIIGCRNNIIDYAYSFFERNDYSIIGLEKLTSSQFEKTKSLPTCKSLLNFHK
VLGHTLSELETLPINDVVKKGYYTFTTDNEGRITDASLSEKGKVRKMKDDFFNQAIKAIHFADVK
DYFATLSNNGQTGIFFVPSQFTSQMDSNTHTLYFENAKNGGLKLASKYQVRQTQEYHLNGLPA
DYNAARNIAYIGLDETMRNTFLKKANSNKSLYNQPIYDTGIKKTAGVFSRMKKLKRYEII*

リピート: AATGTTGTAGATGCCTTTTTATAAGGATTAAACAACTTG (配列番号 9)
スペーサー長: 27

【図２Ｕ】

>Cas12L_21_71317321_部分 (配列番号 **121**)

DVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSK
METMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKD
NTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNG
YVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSF
SDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPF
SNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYH
KILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDY
FITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADY
NAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKIIDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｖ】

>Cas12L_22_71456687 (配列番号 122)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINEHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFEKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｗ】

>Cas12L_23_71708971 (配列番号 123)

DVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSK
METMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKD
NTLLVDIINEHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNG
YVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSF
SDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPF
SNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVDSLLKYH
KILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDY
FITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADY
NAARNIAYIMENTDCRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｘ】

>Cas12L_24_46035167_部分 (配列番号 124)

FVLSLYQLNQYIMASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLT
MKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTG
NILNFSDTYYRRFGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVK
DWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKS
MYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYI
DINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVM
KYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIE
NVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRN
NIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKSFPTVDSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYY
DIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQM
DSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENNECRNMFMKQS
RTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｙ】

>Cas12L_25_46784254_部分 (配列番号 125)

GSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEF
YKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNV
DVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLA
TNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIY
NDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFG
KSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKS
FPTVDSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLM
IKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQE
KHINGLNADYNAARNIAYIMENNECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGF
VKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２Ｚ】

>Cas12L_26_46464451 (配列番号 126)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIDGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNGVVIDA
KLSAKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVDLFCPR*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＡＡ】

>Cas12L_27_254489164 (配列番号 102)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKISELYKYIPNE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVKGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMQYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMVSLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTD
AKLSAKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQ
DNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTDCRNMFMKQSRTDKSLYNKP
SYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＢＢ】

>Cas12L_28_255238293 (配列番号 127)

MAHKKNLEGENLQVKTICLKANLSKEEVKEKWLPVINEYNVYYNRMSDYICSLLGTNITIGEFAE
QLSIEKRKNGYFTICQDDKFKNESLYKIFHKSFPINHGTNIINNIISEKNIDQYDGNTLGFRPTMYR
LRGYVDSVIGNYRTTIRTIKPSVKRHKISVDSSFDEKMEQCIYEIQKGNLKTVSEWNNKIDYLLSK
SDMNPLTIDRFNLLRDFYVDNETEVNEKSNNSSIEQLVKFGGCHRKGDNMTLSLTEANFSIEEID
DSYGYLLTLHTDSGDYKIPLMGSKMLKKGDKCLIDFVNCKKGKSLTAKIDNDYNLYFHFVVYSN
FEKIEDDNINNVVGVDVNSKHMLLMTNVIDDNIDGYVNIYKALVNDDEFKSLVTKSEYDDYVTMS
KYVTFCPIELKYLYARYCVQKDYPISNKDVAIEQCISRVIDKLCKETLDSRANNYLCMVRRIRHYY
KSYYVLKMTYYDKMSEYDTNMEYNDISTTSKETMDQRRFENSFRETDCAKEILSKLDKIGNDIL
GCRNNILTYAYKLFEELGYDTIALENLESSQFDKMKSLPSCQSMLKYHKLEGKTMEEVMSNTSV
KSLIENEYYDFSLNDNKTVENITYTKNGLMKKGFDEFFNLFMKIIHFADIKDKFLQLYNNGSVKVI
LVPSYFTSQMDSSNHSIYMEKSKNDKLVFASKHKVRKTQETHLNGLNADYNAACNIAYIAKDIK
WREKFCKKTSNNGYSTPFYDCATKNQIEMVKRIKQLNAIKMLA*

リピート: ATTGTTGAAATAGTACTTTTATAGTCTATATACAAC (配列番号 11)
スペーサー長: 30

【図２ＣＣ】

>Cas12L_29_72167294 (配列番号 128)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: TATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 13)
スペーサー長: 29

【図２ＤＤ】

>Cas12L_30_72369269 (配列番号 129)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIDGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＥＥ】

>Cas12L_31_72503976 (配列番号 130)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASTISNYVTKISKMSTRSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＦＦ】

>Cas12L_32_72547654_部分 (配列番号 131)

NMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＧＧ】

>Cas12L_33_72907394 (配列番号 132)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNFLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINEHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILHKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＨＨ】

>Cas12L_34_73124743_部分 (配列番号 133)
KKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIY
SVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVP
SYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECR
NMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＩＩ】

>Cas12L_35_73503649_部分(配列番号 134)
NAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILHKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMI
SLEKLTSSQFEKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTK
GELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTVGVSLVPSTV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＪＪ】

>Cas12L_36_73503649_部分(配列番号 135)
MANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIIENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQ
GSTVAKLKKEGFVKILDEASV*

【図２ＫＫ】

>Cas12L_37_73472625 (配列番号 136)
MAHKKQKEENEIIKTISLKVKDYAGYPIVEAMREYTKYYNKISQWINSNLLTIKIGELSAFMPDEC
KTHNYYTYMMSPDWVNEPLYKMFMKGFHAQHCDNILFNVVKTLNIDEYAGNSLGLSASCFRR
SGYFQNVVSNYKSKFANPHISIRRKNLSDLPTEDELVEQCIYEIQNGLSSKTKWEEQIEYLKERD
DSKQIYLTRLNTLFMYYKANKDFVDEQIQIKSVESLANFGGCVRKDDKLSMNLVFSSNSPYKVV
LNEKRNGYILSYSNNFSIELYGNRMGLLNGVEVFNVGDKHSNNITFKMDNDELFVNIPVSVNFV
KKANETNKVVGVDVNLKHSIFATNIIDDGKLDGFVNIYRELLNDVDFVKSCPNELLNFILDVEKYA
FFMPLELGLLSSRVMNQCGYSTIGKYEKLFTTEEHFFRVLRQLEKRFQESGENQKRIYIENVIKM
RAQVKAYFTLKYAYNKANKDYDLKMGFVDESTANKETMDQRRFENQFVNTYTAKEILGKMRRI
ANVITSCRNNIICYMYKIFENNGYGVVALEKLQSSQMKKEKRIPSLLSLLKKQKVEGYTINELKDK
SVFKFIERGYYTFDFDDDNKITGVQFSDAGEVVNMETELHNLALKTIHFADAKDYFVTLSNNGS
VSVALVPSQFTSQMDSTKHVLYAKKNNKGKLGIVSEHEVRPKQECHINGLNGDYNAACNIAYIF
ENDEWRNAFMKMNPNEYGKALFETNMESTSTIINTLKKINPDNIISFDEYEKTKKVAA*

リピート: ATTGTTGTAACATCTATTTTGTAAGGTGTAAACAAC (配列番号 15)
スペーサー長: 30

【図２ＬＬ】

>Cas12L_38_73764039_部分 (配列番号 137)
YPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRRFGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISN
DSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVN
SKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVI
KDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNV
KGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEK
SFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEH
PFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKSFPTVNSLLK
YHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIK
DYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNA
DYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEAS
V*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＭＭ】

>Cas12L_40_74037305 (配列番号 138)
MMKKMRISPHLFYIFFKKIWKCHFFVLSLYQLNQYIMASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDV
LNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKG
YPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRRFGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISN
DSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVN
SKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVI
KDNTLLVDIINEHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNV
NGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEK
SFSNVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEH
PFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLK
YHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIK
DYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNA
DYNAARNIAYIMENTDCRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEAS
V*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＮＮ】

>Cas12L_41_74408273_部分 (配列番号 **139)**
WTDEDYCKFFAKYGMSEECQKWMCRDVYDYRIKDFVDYEKFDDSKIEEEQEEYSEIPVESED
SSPSTSETLPKSIYDLDLRRLDPNPEIPEDEKYNEEDLKNAYPDKYERFEKDGEDYSYIFFKKIW
KCHFFVLSLYQLNQYIMASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIK
DHLTMKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYEALNTCNTE
HYTGNILNFSDTYYRRFGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNG
WTSVKDWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRK
DSKKSMYIMGGSNTPFDITQIDGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKII
NDEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVC
NSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNT
KRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKIL
GCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFEKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVI
KKGYYDIIFDNGVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSY
FTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNM
FMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＯＯ】

>Cas12L_42_75186079_部分 (配列番号 **140)**
YDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTEEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKL
STKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNK
SGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYE
TFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASA*

リピート: AATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 17)
スペーサー長: 29

【図２ＰＰ】

>Cas12L_43_75257103_部分 (配列番号 **141)**
MKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTG
NILNFSDTYYRRFGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVK
DWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKS
MYIMGGSNTPFDITQIDGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYI
DINVSVPFDKKIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVM
KYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIE
NVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEYDFFGETYQFSI*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＱＱ】

>Cas12L_44_75257103_部分 (配列番号 **142)**
MISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELS
KFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDRANKHKVRSSQEKHINGLN
ADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEA
SV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＲＲ】

>Cas12L_45_75616607_部分 (配列番号 **143)**
YIMASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIP
DEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANSRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYY
RRFGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEY
LESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNT
PFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDK
KIATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFV
TFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSNVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQM
KAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFE
INGYDMISLEKLTSSQFEKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNGVVT
DAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFV
QDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNK
PSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＳＳ】

>Cas12L_46_75784289_部分 (配列番号 **144)**
SLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVV
GVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDF
LFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNA
YYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISL
EKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNGVVIDAKLSAKGE
LSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLK
LANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQ
GSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＴＴ】

>Cas12L_47_76512228 (配列番号 145)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINEHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKSFPTVDSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTTTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 19)
スペーサー長 : 30

【図２ＵＵ】

>Cas12L_48_76600450 (配列番号 146)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYETLNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIDGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGVDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFMKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＶＶ】

>Cas12L_49_44880081 (配列番号 147)

MASHKKTESNQIIKTFSFKLKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPD
EKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYR
RFGYVASTISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYL
ESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTP
FDITQIGSNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIIKGHGASFALKIINDEIYIDINVSVPFDKK
IATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILHKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSFFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＷＷ】

>Cas12L_50_83012613 (配列番号 148)

MAHKKNIGAEIVKTYSFKVKNTNGITMEKLMNAIDEYQSYYNLCSDWICKNLTTMTIGDLDQYIP
EKAKDNTYATVLLDEAWKNQPLYKIFGKKYSSNNRDAVLYHALSSIVNASEKNILGISKTYYARK
GYVLNVASNYASKLSKLNTGVKSRAIKETSDEETIIEQVIYEMEHNKWESIEDWKNQIEYLNSKT
DYNPTYMERMKTLSAYYSEHKSEVDAKMQEMAVENLVKFGGCRRNNSKKSMFIMGTTNTNYT
ISYIGGNSFNINFANILNFDVYGRRDVVKNGEVLVDIMANHGDSIVLKIVNGELYADVPCSVTLNK
VESNFDKVVGIDVNMKHMLLSTSVTDNGSLDFLNIYKEMSNNAEFMALCSEDDRKYYKDISQY
VTFAPLELDLLFSRISKQGKVKMEKAYSEILEALKWKFFANGDNKNRIYVESIQKIRQQIKALCIIK
NAYYEQQSAYDIDKTQEYIEAHPFSLTEKGMSIKSKMDNICRTIIGCRNNIIDYAYSFFERNDYSII
GLEKLTSAQFEKTKSLPTCKSLLNFHKVLGHTLSELGTLPINDVVKKGYYTFTTDNEGRITDASL
SEKGKVRKMKDDFFNQTIKAIHFADVKDYFATLSNNGQTGIFFVPSQFTSQMDSSTHNLYFENA
KNGGLKLAPKYKVRQMQEYHLNGLPADYNAARNIAYIGLDETMRNTFLKKANSNKSLYNQPIYD
TGIKKTAGVFYRMKKLKRYEII*

リピート: AATGTTGTAGATACCTTTTTGTAAGGATTGAACAAC (配列番号 21)
スペーサー長: 30

【図２ＸＸ】

>Cas12L_51_82983331 (配列番号 149)

MKRNQKHIKNIEESETIKTISFKVKDYAGIPIVEAMHEYRNYYNRLSRFINSKLLTMTIGELASLLP
ERCKSKGYYLYMTSDEWVNEYVYKMFMESFNSQSCDNIWFNYIKMNNPEEYNGNILGISDSYY
RRNGYFINVISNYKTKFKSPQINVKSKKLSESPTEEELKEQCVYEYVKHNLHSKKDWEEQIKYLD
ERGESKINILERIRTLYQYYKENIPTIKEYIELKSIESIEKFGGCVRKEDKLSMSLQYVSTHNYEIKL
NDTRNGYIISGISKDLSFEVYGNRMGLLGGEEILNIPEKHSTSITFVMRNNSLYVDIPVAVPFSKVI
NDCDGKTVGIDVNLKHALFATSEVDNGQFYDYVNVYAELLKDENFVKVCHKELLDYIKDVSKYV
FFAPIELNLLLSRVMKQKGYENIDNYKKLYKVEEAYLCVLDKLQKRFIDEGNNTKRIYIENLKKMR
AQMKAYYILKDTYSKYQKDYDIEMGFVDESTESKETMDARRSENPFRSTDIAQDILKKMNNVGK
TVEACRNNIIAYIYKVFENSDFATIVLEKLQSSQMKKHKRIPTVNSLLKYHHVEGHTIEETKEMKIY
DVVEKGYYNFIVNEKNEIIDATLTDKGKVIMIEAEFYNFALKSIHFADAKDYFITLSNNGSVNIALV
PSQFTSQMDSIRHAIFVTKGKKGKKVIVDKKYVRPKQEKHINGLNGDYNASRNIAYIFENEELRE
ELLKKEEEYNKYGKVLYDTLIKFPSGVINKLKKFGDKYMTTIENLDEIQVEDVAYV*

リピート: ATTGTTGTAATACTATTTTTGTAAAGTATAAACAAC (配列番号 23)
スペーサー長: 30

【図２ＹＹ】

>Cas12L_52_76767885 (配列番号 150)

MSKLNTGVKRHTIKETSDEATIVEQVIYEMEHNKWESIEDWKNQIEYLNSKTDYNPTYMERMKT
LSAYYSEHKSEVDAKMQEMAVENLVKFGGCRRNNSKKSMFIMGSSKTTYTISYIGDNCFNINFA
NILNFDVYGRRDVVKNGEVLVDIMANHGDSIVLKIVNGELYADVPCSTTLNKVESTFDKVAGIDV
NMKHMLLSTSVTDNGNSDFVNIYKEMSNNAEFMALCPEEDRKYYKDISQYVTFAPLELDLLFSR
ISKQGKVKMEKAYSEILETLKWKFFANGDNKNRIYVESIQKIRQQIKALCVIKNAYYEQQSAYDID
KTQEYIEAHPFSLTEKGMSIKSKMDNICRTIIGCRNNIIDYAYSFFERNDYSIIGLEKLTSSQFEKT
KSLPTCKSLLNFHKVLGHTLSELETLPINDVVKKGYYTFTTDNEGRITDASLSEKGKVRKMKDDF
FNQAIKAIHFADVKDYFATLSNNGQTGIFFVPSQFTSQMDSNTHTLYFENAKNGGLKLASKYKV
RQTQEYHLNGLPADYNAARNIAYIGLDETMRNTFLKKANSNKSLYNQPIYDTGIKKTAGVFSRM
KKLKRYEII*

リピート: AATGTTGTAGATGCCTTTTTATAAGGATTAAACAAC (配列番号 25)
スペーサー長: 30

【図２ＺＺ】

>Cas12L_53_77216451 (配列番号 151)
MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINDEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTDCRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＡＡＡ】

>Cas12L_54_77468912_部分 (配列番号 152)
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＢＢＢ】

>Cas12L_55_77738117 (配列番号 153)
MASHSSLSNNQIFKTFSFKVKSSNLSKDFFDVIKEYQEYYNKCSDVILENLTCIKIGDIFDMIPEKS
KKSDYAQYAISDEWKNVPLYNIFSKAFAPMHRDNLLYIWLTKLVPYTGNLLKISDTFYKRNGFIK
SVISNYTTSFTNIKPKVKFQKLTGDDSHEMLLTQTICDMVKFNLYDIKSWEEMVSYFEMKSETSE
DTLNRIHTLFDFYKNNTPEVEDKYNELVTESLSKFGGCRRDMSKLTMSIQLSKKVIKVTHGYNTL
NYKYGKLIDLELWGRKDIINNDELLINLENVCEMIVFKIKNGEIYVDIPFKVDFIKKDQTIDKIAGVD
ANIKHMLLSTSVKDENLIGYTNIYKEVINDSDFQKVCDNKTMKILQEISNYVTFAPIEFDMLFSRIS
KQREMKDKYINMEIAFTNVLNKLKQKFIVNSDNKNRIYIESILKIRSQLKSYAILEEVKYKKASEYD
SAIVEEFGVEYLETHPFKDTETYKEINKKILNISENIIGCRNNIIQYAYKIFESNGFDMISLENLTNS
NFKKKEKNMPTIKSLLSYHHVLGKTNEEIEKLDVYSVIKKGYYTFEYKDGKVVNAKLSEIGEMIKIK
TTMFNMMIKSIHFAEIKDYFITLANNGEVGVSLVPSYYTSQMDSTDHKVFGLLSKKGKWTLVDK
RKVRKNQETHINGLNADYNAAKNIAFILSDEVWRNKFTKKTKTPKYNTPSYYTSINSQGKMLRA
LKSLKAFKEFKI*

リピート: ATTGTTGTAATACACTTTTTATAAGGTATGAACAAC (配列番号 27)
スペーサー長: 30

【図２ＣＣＣ】

>Cas12L_56_65286425 (配列番号 154)
MKIGELYKYIPDEKKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANNRDNAIYEALNTCNTEHYTG
NILNFSDTYYRRFGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVK
DWENQMEYLESKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKS
MYIMGGSNTPFDITQIGGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINEHGASFVLKIINDEIYI
DINVSVPFDKKIATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMQ
YFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIEN
VMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNI
IQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDI
IFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDS
IDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRT
DKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＤＤＤ】

>Cas12L_57_65567118_部分 (配列番号 155)
KIINDEIYIDINVSVPFDKKIATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKV
CNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNRLKWNFIETGD
NTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISK
KILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKIRGGTQEEMEKKDIY
SVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVP
SYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENNECR
NMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＥＥＥ】

>Cas12L_58_66287853_部分 (配列番号 156)
DDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTFCPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDN
SAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKAYAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEE
FIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEINGYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTV
NSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDAKLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIH
FADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQDNKSGKLKLANKHKVRSSQEKHIN
GLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPSYETFIKTQGSAVAKLKKDGFVKIL
DEASA*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

【図２ＦＦＦ】

>Cas12L_39_73877227 (配列番号 157)

MASHKKTESNQIIKTFSFKIKNANGLSLDVLNDAITEYQNYYNICSDWIKDHLTMKIGELYKYIPDE
KKNSGYALTLISDEWKDKPMYMMFKKGYPANSRDNAIYEALNTCNTEHYTGNILNFSDTYYRR
FGYVASAISNYVTKISKMSTGSRSKNISNDSDVDTIMEQVIYEMEHNGWTSVKDWENQMEYLE
SKTDSNPNFVYRMTTLYEFYKSHIDEVNSKMETMSIDSLIKFGGCRRKDSKKSMYIMGGSNTPF
DITQIDGNSLNIKFSKNLNVDVFGRYDVIKDNTLLVDIINGHGASFVLKIINGEIYIDINVSVPFDKKI
ATTNKVVGIDVNIKHMLLATNILDDGNVNGYVNIYKEVINDSDFKKVCNSTVMKYFTDFSKFVTF
CPLEFDFLFSRVCNQKGIYNDNSAMEKSFSDVLNKLKWNFIETGDNTKRIYIENVMKLRSQMKA
YAIVKNAYYKQQSEYDFGKSEEFIQEHPFSNTDKGIEILNKLDNISKKILGCRNNIIQYSYNLFEIN
GYDMISLEKLTSSQFKKKPFPTVNSLLKYHKILGCTQEEMEKKDIYSVIKKGYYDIIFDNDVVTDA
KLSTKGELSKFKDDFFNLMIKSIHFADIKDYFITLSNNGTAGVSLVPSYFTSQMDSIDHKIYFVQD
NKSGKLKLANKHKVRSSQEKHINGLNADYNAARNIAYIMENTECRNMFMKQSRTDKSLYNKPS
YETFIKTQGSAVAKLKKEGFVKILDEASV*

リピート: ATTGTTGTAACTCTTATTTTGTATGGAGTAAACAAC (配列番号 1)
スペーサー長: 30

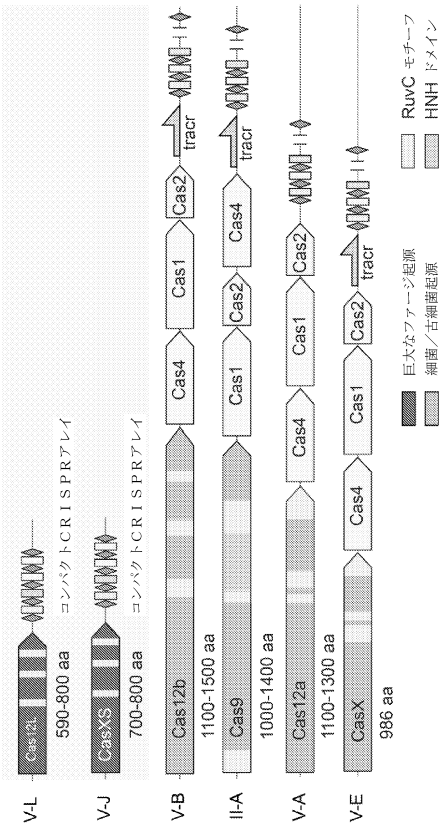
【図３Ａ】

	RuvC-I	RuvC-II	RuvC-III
Cas12L_1_257905508	336	530	682
Cas12L_2_196848753	335	523	676
Cas12L_3_66741167	368	562	714
Cas12L_4_67031163	368	562	714
Cas12L_5_67793351	368	562	714
Cas12L_6_67912869_部分		139	292
Cas12L_7_68090316_部分	302	501	653
Cas12L_8_68328292_部分	359	553	705
Cas12L_9_68454124	336	530	682
Cas12L_10_68605313	372	566	718
Cas12L_11_69266821_部分			28
Cas12L_12_69417229_部分			28
Cas12L_13_69733214	336	530	682
Cas12L_14_70235246_部分	17	211	363
Cas12L_15_70724743	336	530	682
Cas12L_16_70731038	335	523	676
Cas12L_17_70959391	336	530	682
Cas12L_18_71078086	336	530	682
Cas12L_19_71193509_部分	270	464	616
Cas12L_20_71210958_部分	116	304	457
Cas12L_21_71317321_部分	175	369	521
Cas12L_22_71456687	336	530	682
Cas12L_23_71708971	175	369	521
Cas12L_24_46035167_部分	348	542	594
Cas12L_25_46784254_部分	186	380	532
Cas12L_26_46464451	336	530	
Cas12L_27_254489164	336	530	682
Cas12L_28_255238293	343	542	701
Cas12L_29_72167294	336	530	682
Cas12L_30_72369269	336	530	682
Cas12L_31_72503976	336	530	682
Cas12L_33_72907394	336	530	682
Cas12L_34_73124743_部分		29	181
Cas12L_35_73503649_部分		70	
Cas12L_36_73503649_部分			21
Cas12L_37_73472625	334	545	698
Cas12L_38_73764039_部分	242	436	588
Cas12L_39_73877227	336	530	682
Cas12L_40_74037305	372	566	718

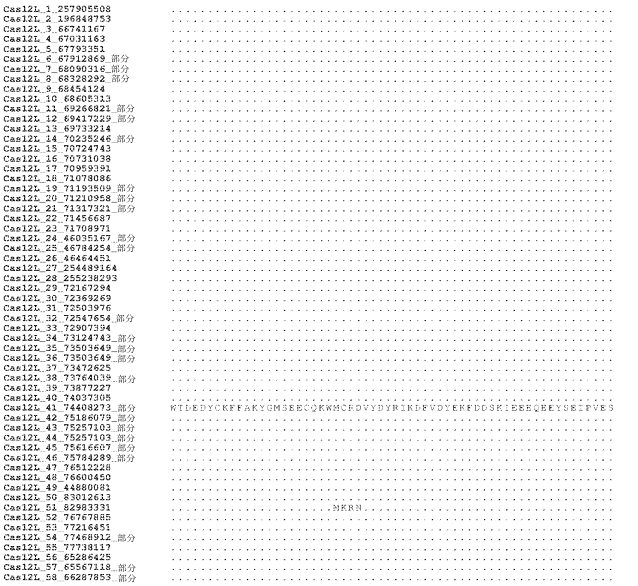
【図３Ｂ】

Cas12L_41_74408273_部分	479	673	825
Cas12L_42_75186079_部分		7	159
Cas12L_43_75257103_部分	282		
Cas12L_44_75257103_部分		5	132
Cas12L_45_75616607_部分	338	532	684
Cas12L_46_75784289_部分	71	265	417
Cas12L_47_76512228	336	530	682
Cas12L_48_76600450	336	530	682
Cas12L_49_44880081	336	530	682
Cas12L_50_83012613	335	523	676
Cas12L_51_82983331	341	552	705
Cas12L_52_76767885	192	380	533
Cas12L_53_77216451	336	530	682
Cas12L_55_77738117	330	527	679
Cas12L_56_65286425	282	476	628
Cas12L_57_65567118_部分	31	225	377
Cas12L_58_66287853_部分		181	333

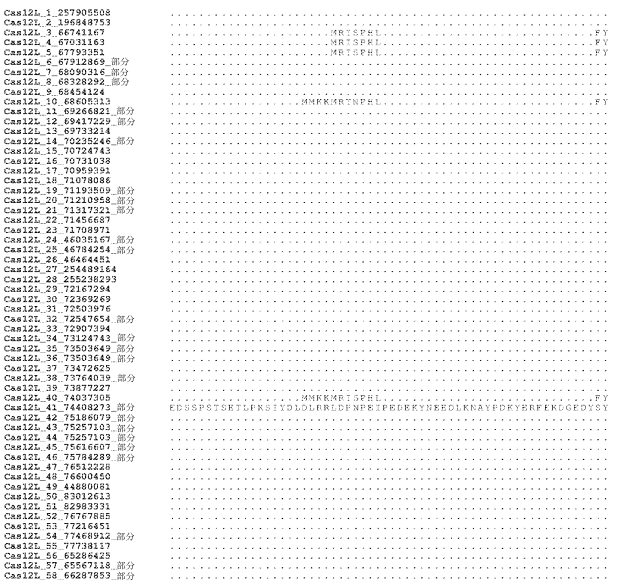
【図４】



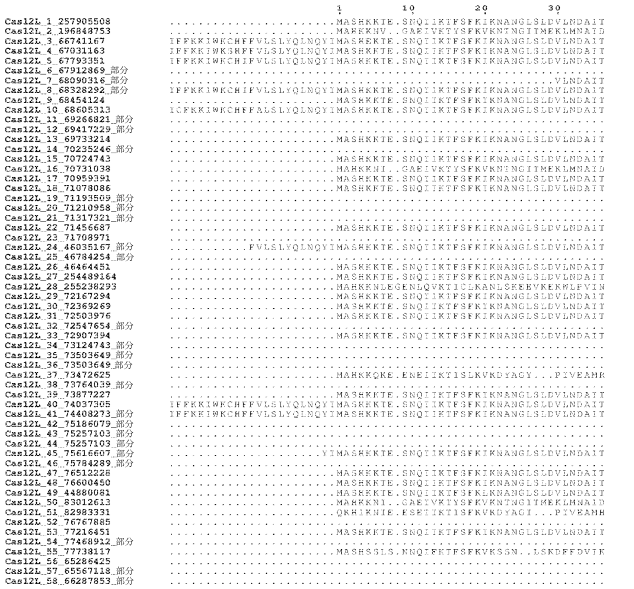
【図５Ａ】



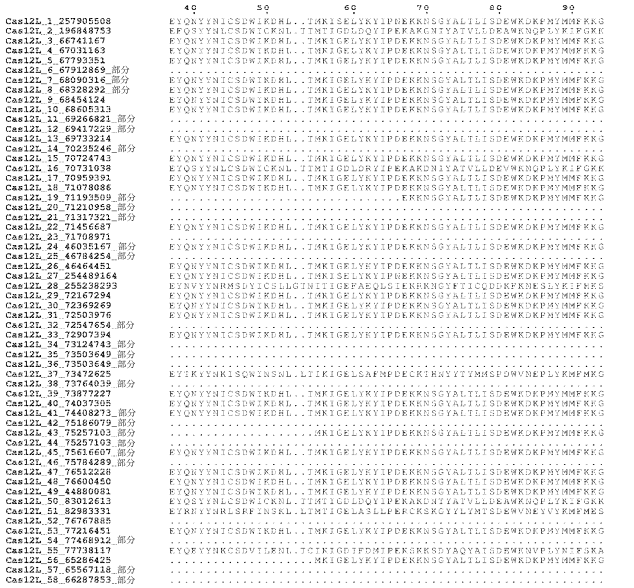
【図５Ｂ】



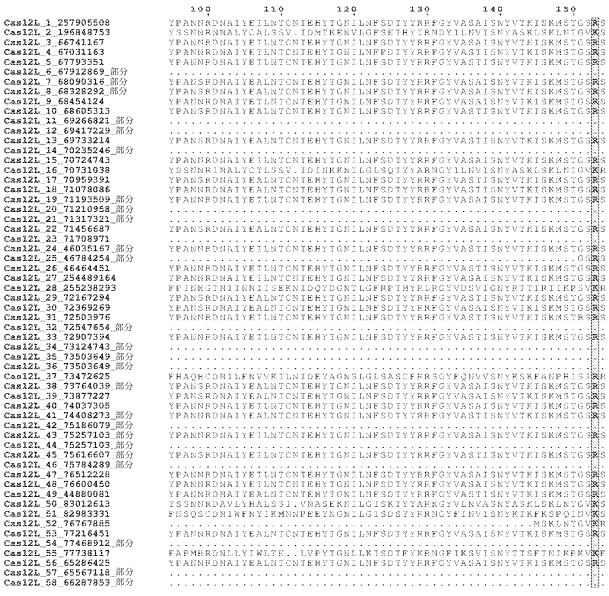
【図５Ｃ】



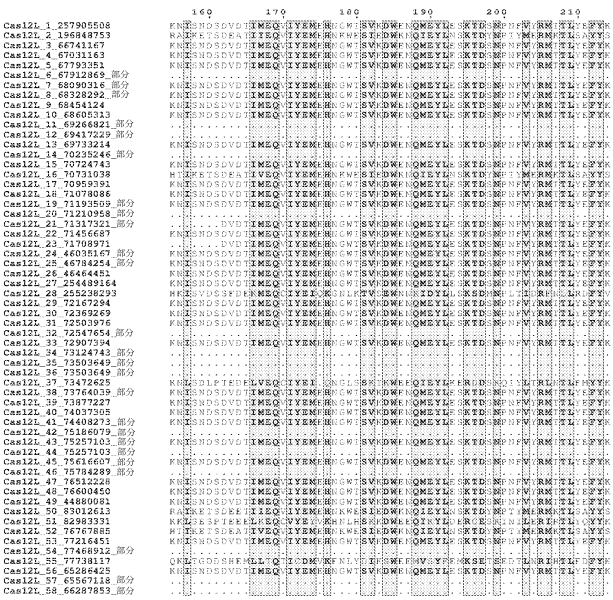
【図５Ｄ】



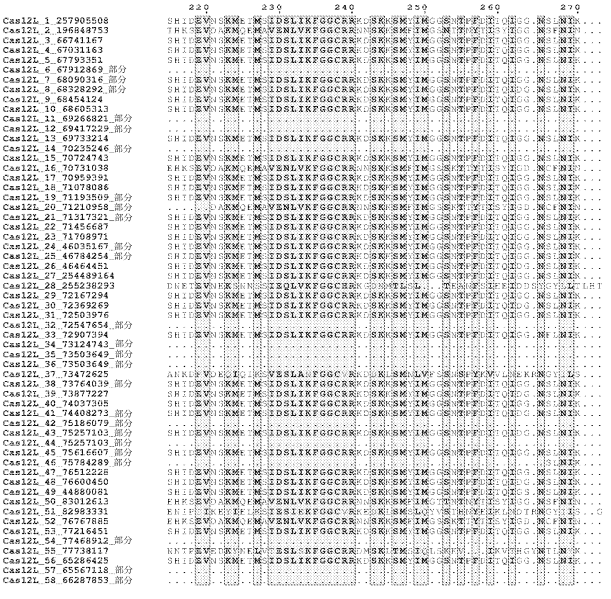
【図５Ｅ】



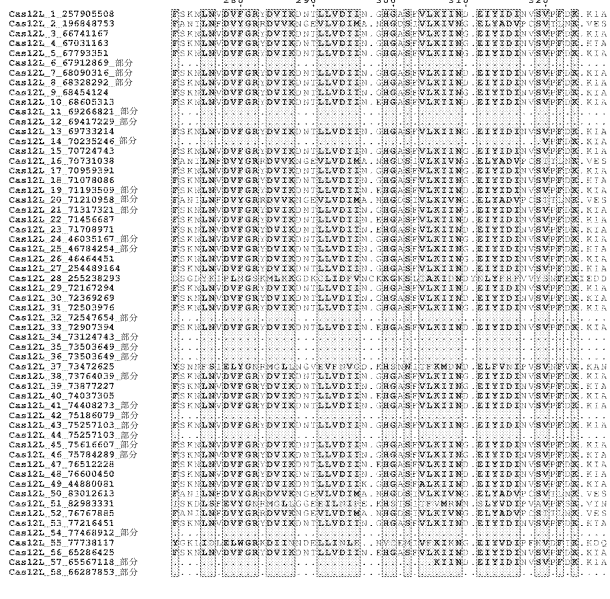
【図５Ｆ】



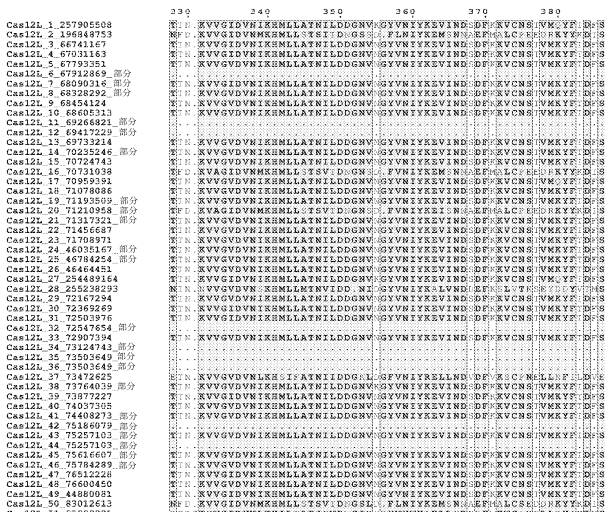
【図５Ｇ】



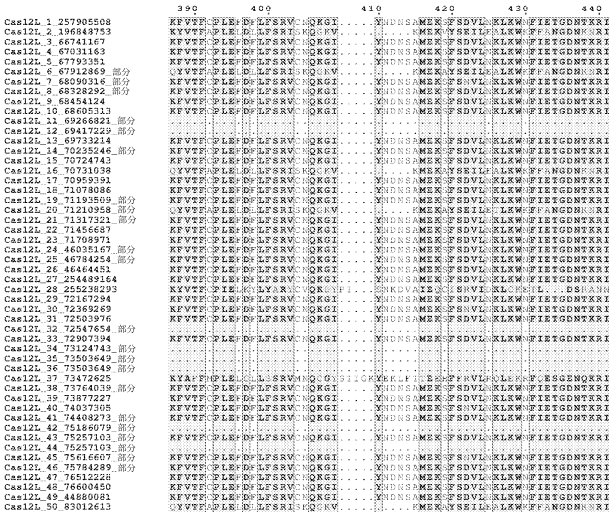
【図５Ｈ】



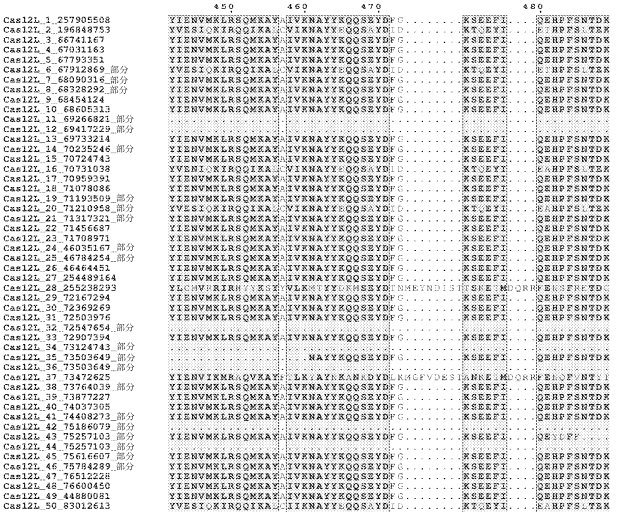
【図５Ｉ】



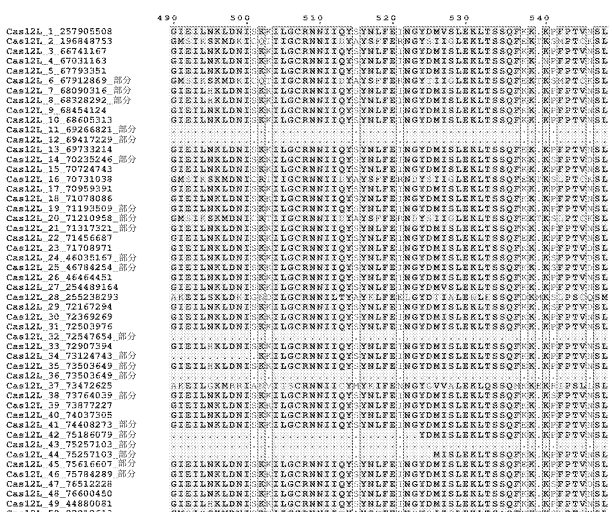
【図５Ｊ】



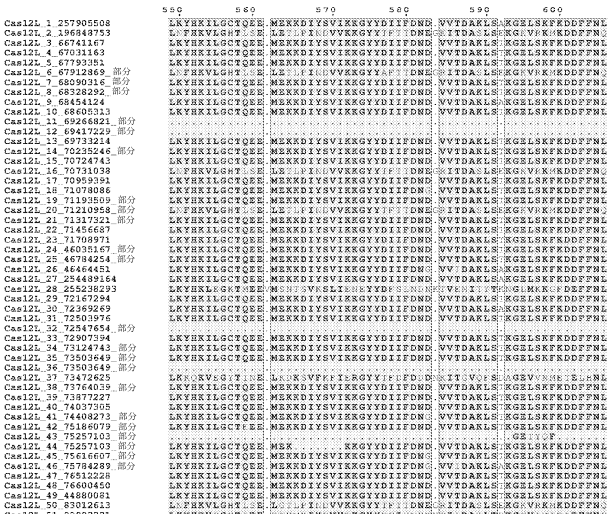
【図５Ｋ】



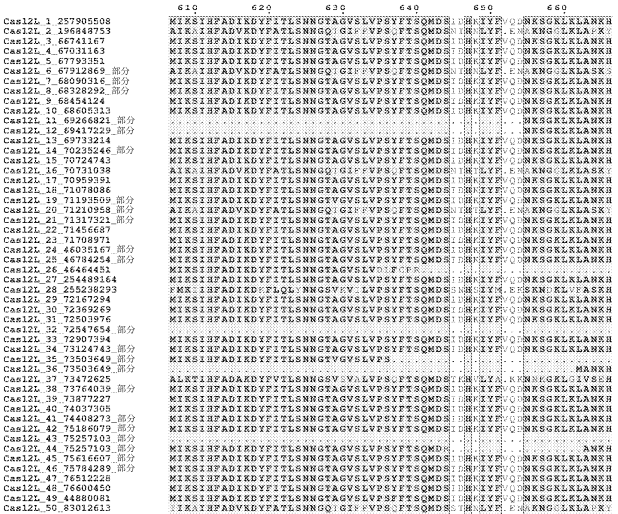
【図５Ｌ】



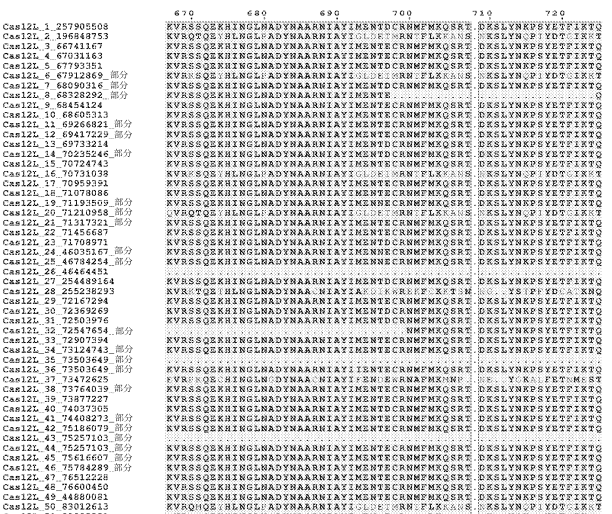
【図５Ｍ】



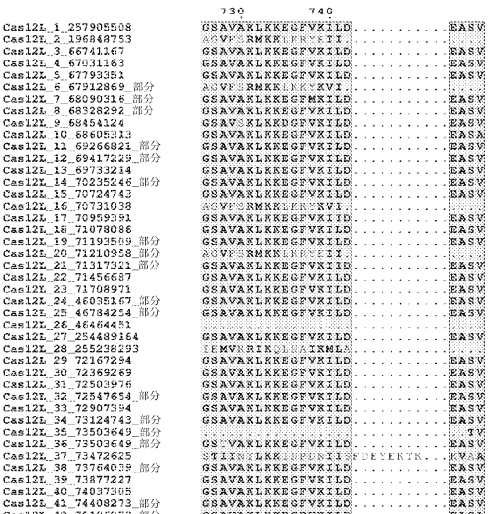
【図５Ｎ】



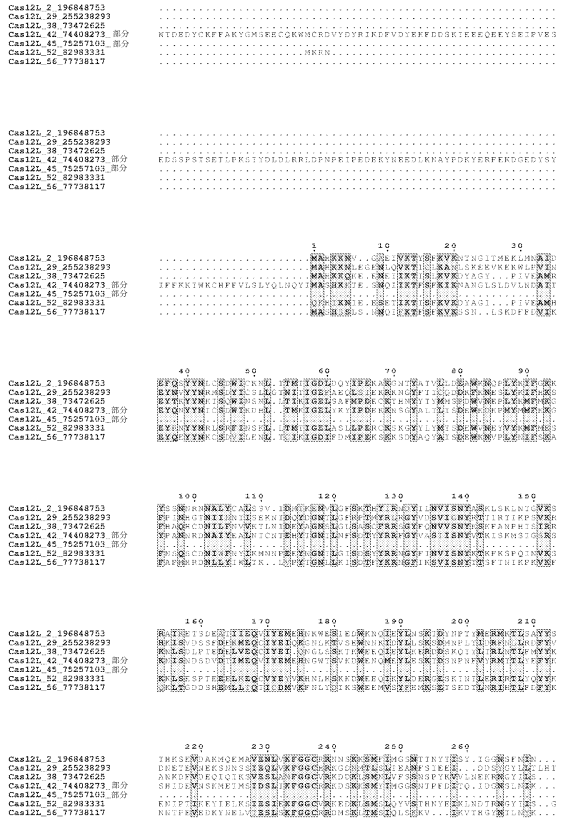
【図５Ｏ】



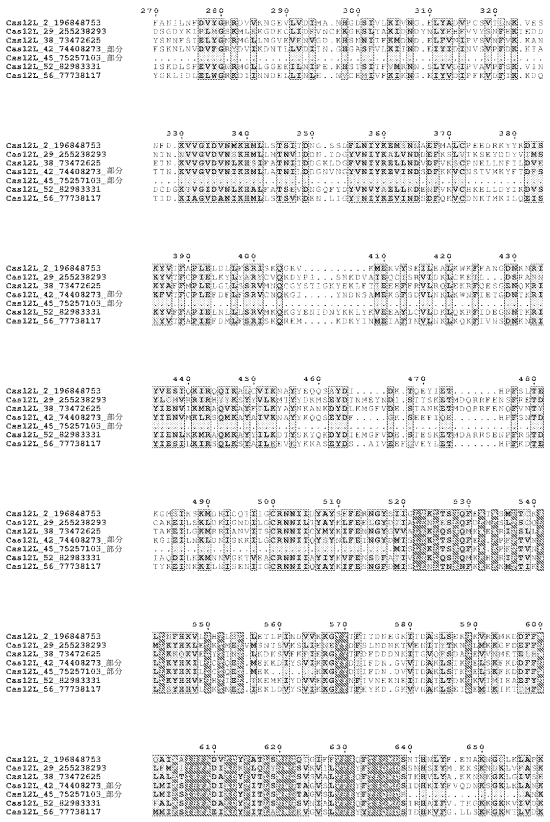
【図５Ｐ】



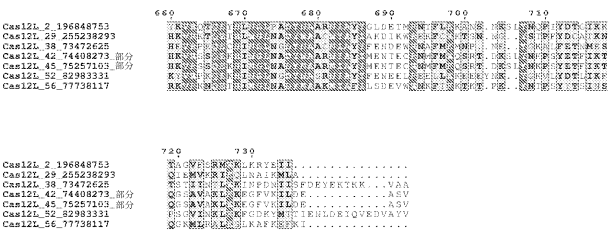
【図６Ａ】



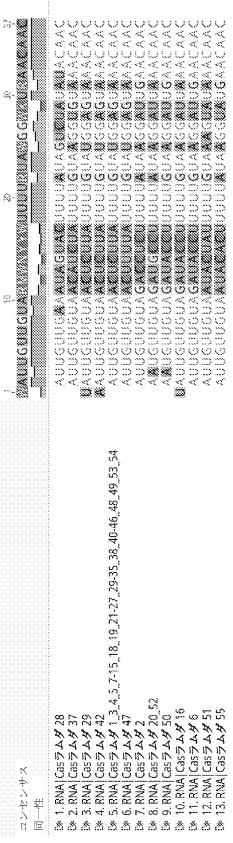
【図６Ｂ】



【図６Ｃ】

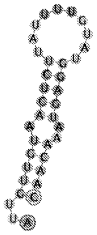


【図７】



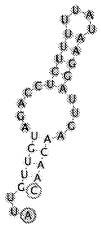
【図８Ａ】

Casλ1 (配列番号 59)



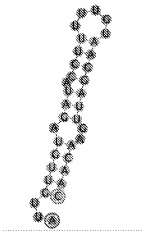
【図８Ｂ】

Casλ2 (配列番号 60)



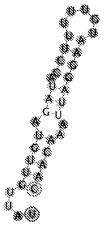
【図８Ｃ】

Casλ6 (配列番号 164)



【図８Ｄ】

Casλ16 (配列番号 61)



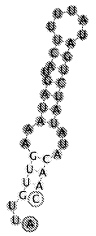
【図８Ｅ】

Casλ20_52 (配列番号 68)



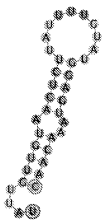
【図８Ｆ】

Casλ28 (配列番号 63)



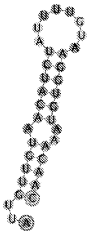
【図８Ｇ】

Casλ29 (配列番号 64)



【図８Ｈ】

Casλ37 (配列番号 70)



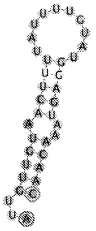
【図８Ｉ】

Casλ42 (配列番号 163)



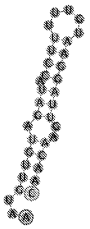
【図８Ｊ】

Casλ47 (配列番号 65)



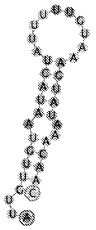
【図８Ｋ】

Casλ50 (配列番号 66)

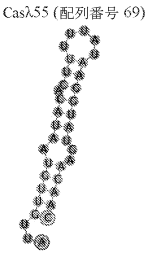


【図８Ｌ】

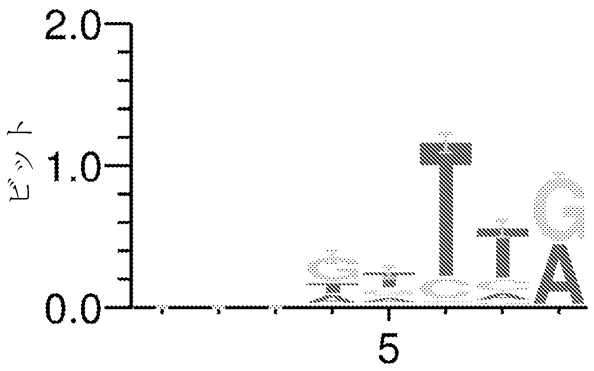
Casλ51 (配列番号 67)



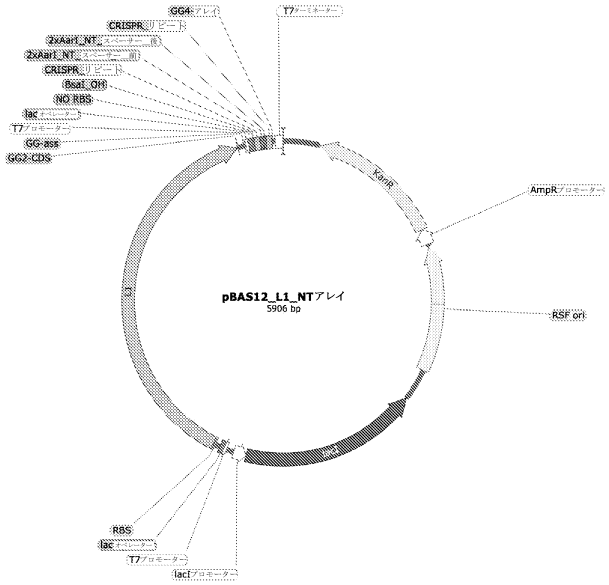
【図８Ｍ】



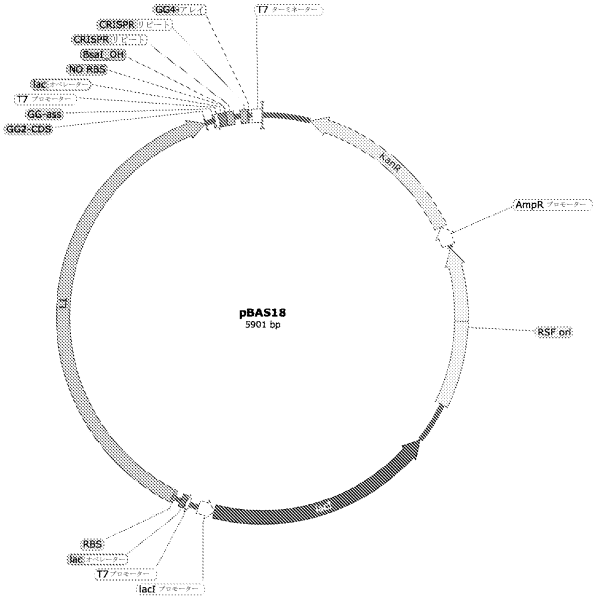
【図９】



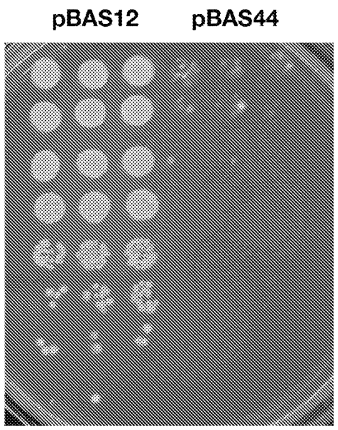
【図１０】



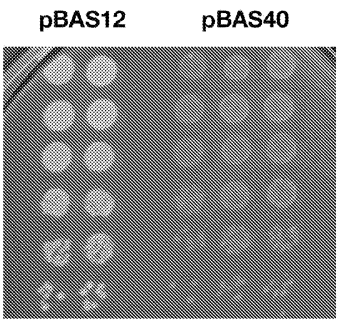
【図１１】



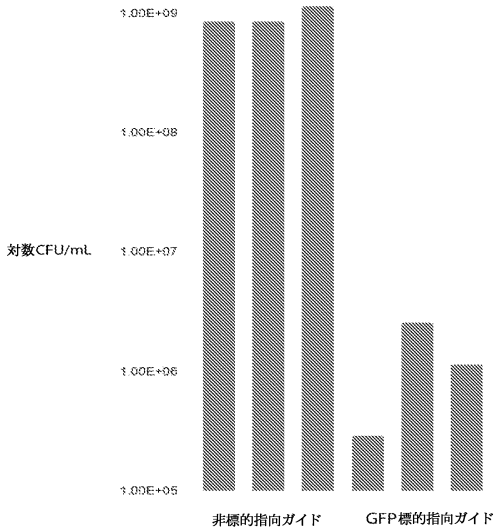
【図１２Ａ】



【図１２Ｂ】



【図１２Ｃ】



【配列表】

2023508362000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/66672

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C07K 14/195; C12N 9/22; A61K 38/46; C12Q 1/34 (2020.01)

CPC - C07K 14/195; C12N 9/22; A61K 38/164; C12Q 1/34; C12N 5/10; C12N 15/52; C12N 15/62; A61K 38/00; G01N 33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019/0276842 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 12 September 2019; paragraphs [0005], [0006], [0012], [0042], [0068], [0356] [0416]-[0423], [0426]-[0438]	1-7, 14-17, 47-50, 60-68, 80-82, 105-113
A	WO 2014/093622 A2 (THE BROAD INSTITUTE, INC.) 19 June 2014; paragraphs [0007], [0015], [0016], [0024], [0027], [0063], [00164], [00439], [00662], [00663]	1-7, 14-17, 47-50, 60-68, 80-82, 105-113
A	US 2019/0241954 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 08 August 2019; abstract	122-132
P,Y	ALIAGA GOLTSMAN. "Novel Type V-A CRISPR Effectors Are Active Nucleases with Expanded Targeting Capabilities" . The CRISPR Journal. . 17 December 2020; page 456, first column, fourth paragraph; DOI: DOI: 10.1089/crispr.2020.0043	1, 14, 47, 60, 80, 105, 122
A	RUSK. "Spotlight on Cas12" 215. Nature Methods. . 27 February 2019; Entire Document; DOI: https://doi.org/10.1038/s41592-019-0347-5	1-7, 14-17, 47-50, 60-68, 80-82, 105-113, 122-132
A	YAN. "Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems" 88-91. Science. . 12 June 2018; Entire Document; DOI: 10.1126/science.aav7271	1-7, 14-17, 47-50, 60-68, 80-82, 105-113, 122-132

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 March 2021 (18.03.2021)	MAY 03 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/66672

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/66672

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: **8-13, 18-46, 51-59, 69-79, 83-104, 114-121, 133-144**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*1/15 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｎ	*15/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/10	Ｚ	
Ａ０１Ｋ	*67/027(2006.01)*	Ａ０１Ｋ	67/027		
Ｃ１２Ｍ	*1/00 (2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	1/00	Ａ	
Ｃ１２Ｍ	*1/28 (2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	1/28		
Ｃ１２Ｍ	*1/34 (2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	1/34	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6818(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6818	Ｚ	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　ダウドナ ジェニファー エイ.
アメリカ合衆国 ９４７０５ カリフォルニア州 バークレー ヴィセンテ ロード １６４
(72)発明者　アルーシャエブ バシム
アメリカ合衆国 ９４７１０ カリフォルニア州 バークレー シックスス ストリート １７１５
(72)発明者　バンフィールド ジリアン エフ.
アメリカ合衆国 ９４７０８ カリフォルニア州 バークレー ヒル ロード １６０

Ｆターム（参考）　4B029　AA07 AA08 BB20 GA08 GB05 HA10
4B050　CC04 DD02 KK07 KK11 LL01 LL03
4B063　QA01 QA13 QA18 QQ42 QR10 QR56 QS36 QX02
4B065　AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 BD50 CA27 CA44 CA46
4H045　AA10 AA20 AA30 BA10 CA11 EA50