(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-549339
(P2023-549339A)
(43)公表日　令和5年11月24日(2023.11.24)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	２Ｂ０３０
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*9/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/12		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ１２Ｎ	*9/16 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/16	Ｚ	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全128頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-527427(P2023-527427)
(86)(22)出願日　令和3年11月5日(2021.11.5)
(85)翻訳文提出日　令和5年7月10日(2023.7.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/058235
(87)国際公開番号　WO2022/098993
(87)国際公開日　令和4年5月12日(2022.5.12)
(31)優先権主張番号　63/110,386
(32)優先日　令和2年11月6日(2020.11.6)
(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　522269901
ペアワイズ・プランツ・サーヴィシズ，インコーポレイテッド
ＰＡＩＲＷＩＳＥ ＰＬＡＮＴＳ ＳＥＲＶＩＣＥＳ， ＩＮＣ．
アメリカ合衆国，ノースカロライナ州，ダラム，イースト・メイン・ストリート ８０７，スイート ４－１００
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山 尚一
(74)代理人　100125380
弁理士　中村 綾子
(74)代理人　100142996
弁理士　森本 聡二
(74)代理人　100166268
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　対立遺伝子の、ＲＮＡによりコードされるＤＮＡ置換のための組成物および方法

(57)【要約】
本発明は、植物における核酸を修飾するためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、逆転写酵素および拡張ガイド核酸を含む組換え核酸構造体ならびにその使用方法に関する。

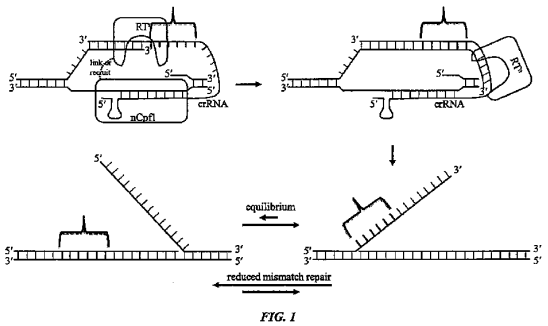


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
標的核酸を
（ａ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；
（ｂ）逆転写酵素、ならびに
（ｃ）拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ）
と接触させることを含み、それによって標的核酸を修飾する、標的核酸を修飾する方法。
【請求項２】
前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質もしくは前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、前記逆転写酵素、および前記拡張ガイド核酸が複合体を形成しているか、または複合体中に含まれている、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記拡張ガイド核酸が、
（ｉ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ核酸もしくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ）、および／またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸もしくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸とｔｒａｃｒ核酸（例えば、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＤＮＡ）；ならびに
（ｉｉ）プライマー結合部位および逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）（ＲＴＴ）を含む拡張部分
を含む、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記拡張部分が、前記ＣＲＩＳＰＲ核酸の５’末端または３’末端のいずれか（例えば、５’から３’の向き：反復－スペーサー－拡張部分、または拡張部分－反復－スペーサー）、および／または前記ｔｒａｃｒ核酸の５’もしくは３’末端に融合されている、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記拡張ガイド核酸の前記拡張部分が、５’から３’の向きにＲＴ鋳型とプライマー結合部位を含む、請求項３または請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記拡張ガイド核酸が、構造化ＲＮＡモチーフをさらに含む、請求項１から５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記構造化ＲＮＡモチーフが、前記拡張ガイド核酸の３’末端に位置している、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記構造化ＲＮＡモチーフが、ＡｓＣｐｆ１ＢＢ（配列番号１８９）、ボックスＢ（配列番号１９０）、シュードノット（デコイ）（配列番号９５、配列番号２０３）、シュードノット（ｔＥｖｏＰｒｅＱ１）（配列番号１９１）、ｆｍｐｋｎｏｔ（配列番号１９２）、ｍｐｋｎｏｔ（配列番号１９３）、ＭＳ２（配列番号１９４）、ＰＰ７（配列番号１９５）、ＳＬＢＰ（配列番号１９６）、ＴＡＲ（配列番号１９７）、および／またはＴｈｅｒｍｏＰｈ（配列番号１９８）である、請求項６または請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記構造化ＲＮＡモチーフがシュードノットである、請求項６から８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記シュードノットが、配列番号１５８の核酸配列を含むｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュード

ノットまたは配列番号１９１の核酸配列を含むＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットである、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記シュードノットが、配列番号９５または配列番号２０３の核酸配列を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
前記標的核酸が二本鎖であり、第１鎖および第２鎖を含み、前記プライマー結合部位が前記標的核酸の第２鎖（非標的、トップ鎖）に結合する、請求項５から１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記標的核酸が二本鎖であり、第１鎖および第２鎖を含み、前記プライマー結合部位が前記標的核酸の第１鎖に結合する（例えば、標的の鎖、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が動員される鎖と同じ鎖、ボトム鎖に結合する）、請求項５から１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記標的核酸が二本鎖であり、第１鎖および第２鎖を含み、前記プライマー結合部位が標的核酸の第２鎖（非標的鎖、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が動員される鎖とは反対の鎖）に結合する、請求項５から１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記プライマー結合部位（ＰＢＳ）が、約１ヌクレオチドから約１００ヌクレオチドの長さ、場合によっては、前記ＰＢＳが、約４ヌクレオチドから約８０ヌクレオチド、約３０ヌクレオチドから約８０ヌクレオチド、約４０から約６０ヌクレオチドの長さ、または約８、１６、２４、３２、４０、４８、５６、６４、７２、もしくは８０ヌクレオチドの長さである、請求項３から１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記ＲＴ鋳型（ＲＴＴ）が、約１から約１００ヌクレオチドの長さ、場合によっては、前記ＲＴＴが、約３５から約１００、約３５ヌクレオチドから約８０ヌクレオチドの長さ、場合によっては、約３５ヌクレオチドから約７５ヌクレオチド、約４０ヌクレオチドから約７５ヌクレオチド、約４５ヌクレオチドから約７５ヌクレオチド、約４５ヌクレオチドから約６０ヌクレオチド、または約３６、４０、４４、４７、５０、５２、５５、６３、７２もしくは７４ヌクレオチドの長さである、請求項３から１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記ＲＴＴが、約３５ヌクレオチドから約７５ヌクレオチドの長さ、前記ＰＢＳが、約３０ヌクレオチドから約８０ヌクレオチドの長さであり、場合によっては、前記ＰＢＳが、約８、１６、２４、３２、４０、４８、５６、６４、７２、もしくは８０ヌクレオチドの長さ、前記ＲＴＴが、約３６、４０、４４、４７、５０、５２、５５、６３、７２もしくは７４ヌクレオチドの長さである、請求項３から１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記拡張ガイドＲＮＡの前記拡張部分が、リンカーを介してＣＲＩＳＰＲ核酸および／またはｔｒａｃｒＲＮＡに連結されている、請求項３から１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記リンカーが１から１００ヌクレオチドの長さである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記拡張部分がｃｒＲＮＡの５’に位置している場合、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、自己処理ＲＮＡｓｅ活性を低減（または排除）するように改変されている、請求項３から１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質または前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ

－Ｃａｓエフェクタータンパク質が融合タンパク質であり、および／または前記逆転写酵素が融合タンパク質であり、ここで、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質もしくは前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質、前記逆転写酵素融合タンパク質および／または前記拡張ガイド核酸が、前記逆転写酵素を前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質または前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に動員する１つまたは複数の成分に融合されており、場合によっては、１つまたは複数の前記成分は、タンパク質－タンパク質相互作用、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、および／または化学的相互作用を介して動員する、請求項１から２０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクター融合タンパクであり、前記逆転写酵素が、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合（連結）された逆転写酵素ドメインを含む逆転写酵素融合タンパク質であり、場合によっては、前記標的核酸が、２つ以上の逆転写酵素融合タンパク質と接触させられる、あるいは、前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクター融合タンパク質であり、前記逆転写酵素が、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合（連結）された逆転写酵素ドメインを含む逆転写酵素融合タンパク質であり、場合によっては、前記標的核酸が、２つ以上の逆転写酵素融合タンパク質と接触させられる、請求項１から２１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２３】

前記ペプチドタグが、ＧＣＮ４ペプチドタグ（例えば、Ｓｕｎ－Ｔａｇ）、ｃ－Ｍｙｃ親和性タグ、ＨＡ親和性タグ、Ｈｉｓ親和性タグ、Ｓ親和性タグ、メチオニン－Ｈｉｓ親和性タグ、ＲＧＤ－Ｈｉｓ親和性タグ、ＦＬＡＧオクタペプチド、ｓｔｒｅｐタグまたはｓｔｒｅｐタグＩＩ、Ｖ５タグ、および／またはＶＳＶ－Ｇエピトープを含む、請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】

前記ペプチドタグが、前記ペプチドタグの２つ以上のコピーを含む、請求項２２または請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

前記親和性ポリペプチドが、抗体、アフィボディ、アンチカリン、モノボディおよび／またはＤＡＲＰｉｎである、請求項２２から２４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２６】

前記抗体がｓｃＦｖ抗体である、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記拡張ガイド核酸が、ＲＮＡ動員モチーフに連結されており、前記逆転写酵素が、ＲＮＡ動員モチーフに結合する親和性ポリペプチドに融合（連結）された逆転写酵素ドメインを含む逆転写酵素融合タンパク質であり、場合によっては、前記標的核酸が、２つ以上の逆転写酵素融合タンパク質と接触させられ、場合によっては、前記拡張ガイドＲＮＡが、２つ以上のＲＮＡ動員モチーフに連結されており、場合によっては、前記２つ以上のＲＮＡ動員モチーフが、同じＲＮＡ動員モチーフまたは異なるＲＮＡ動員モチーフである、請求項１から２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】

前記動員モチーフが、前記拡張ガイド核酸の前記拡張部分の３’末端に位置しているか、前記拡張部分に埋め込まれている、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

前記ＲＮＡ動員モチーフおよび対応する親和性ポリペプチドが、テロメラーゼＫｕ結合モチーフ（例えば、Ｋｕ結合ヘアピン）およびＫｕの親和性ポリペプチド（例えば、Ｋｕ

ヘテロダイマー）；テロメラーゼＳｍ７結合モチーフおよびＳｍ７の親和性ポリペプチド；ＭＳ２ファージオペレーターステムループおよび親和性ポリペプチドＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）、ＰＰ７ファージオペレーターステムループおよび親和性ポリペプチドＰＰ７コートタンパク質（ＰＣＰ）；ＳｆＭｕファージＣｏｍステムループおよび親和性ポリペプチドＣｏｍ　ＲＮＡ結合タンパク質；ＰＵＦ結合部位（ＰＢＳ）および親和性ポリペプチドＰｕｍｉｌｉｏ／ｆｅｍ－３ｍＲＮＡ結合因子（ＰＵＦ）；および／または合成ＲＮＡ－アプタマーおよび対応するアプタマーリガンドである、請求項２７または請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】

前記ＲＮＡ動員モチーフおよび対応する親和性ポリペプチドが、ＭＳ２ファージオペレーターステムループおよび親和性ポリペプチドＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）、および／またはＰＵＦ結合部位（ＰＢＳ）および親和性ポリペプチドＰｕｍｉｌｉｏ／ｆｅｍ－３ｍＲＮＡ結合因子（ＰＵＦ）である、請求項２７から２９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３１】

化学的相互作用を動員する１つまたは複数の前記成分が、ＦＲＢ－ＦＫＢＰのラパマイシン誘導性二量体化；ビオチン－ストレプトアビジン；ＳＮＡＰタグ；Ｈａｌｏタグ；ＣＬＩＰタグ；化合物によって誘導されるＤｍｒＡ－ＤｍｒＣヘテロダイマー；二機能性リガンド（例えば、２つのタンパク質結合性化学物質を一緒に融合したもの、例えばジヒドロフォレート還元酵素（ＤＨＦＲ）である、請求項２１に記載の方法。

【請求項３２】

標的核酸を

（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；ならびに

（ｂ）ガイド核酸

と接触させることをさらに含み、（ｉ）前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質によってニッキングされた第２の鎖上の部位から約１０から約１２５塩基対（５’か３’のいずれか）離れて位置する標的核酸の第１の鎖上の部位をニッキングまたは切断するか、または（ｉｉ）前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質によってニッキングされた第１の鎖上の部位から約１０から約１２５塩基対（５’または３’のいずれか）離れて位置する標的核酸の第２の鎖上の部位をニッキングまたは切断し、それによってミスマッチ修復を改善し、ここで、前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパクが、Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質である、請求項１から３１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３３】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質が、クロマチン調節ペプチドに融合されている、請求項２１から３２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３４】

前記クロマチン調節ペプチドが、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質のＣ末端および／またはＮ末端に融合されている、請求項２１から３３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３５】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質が、そのＮ末端において逆転写酵素に融合されており、前記クロマチン調節ペプチドが、前記逆転写酵素のＮ末端に融合されている、請求項２１から３４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３６】

前記クロマチン調節ペプチドが、ＣＨＤ１（例えば、配列番号１９９）、Ｈ１Ｇ（例え

ば、配列番号２００）、ＨＢ１（例えば、配列番号２０１）、およびＨＮ１（例えば、配列番号２０２）である、請求項３３から３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記標的核酸を、Ｄｎａ２ポリペプチドおよび／または５’フラップエンドヌクレアーゼ（ＦＥＮ）、場合によってはＦＥＮ１ポリペプチドと接触させることをさらに含む、請求項１から３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
前記ＦＥＮおよび／またはＤｎａ２ポリペプチドが（標的核酸の存在下で）過剰発現される、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ＦＥＮが、前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはドメインに融合されたＦＥＮドメインを含む融合タンパク質である、および／または前記Ｄｎａ２ポリペプチドが、前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはドメインに融合されたＤｎａ２ドメインを含む融合タンパク質である、請求項３７または請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパクであり、前記ＦＥＮが、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＦＥＮドメインを含むＦＥＮ融合タンパク質であり、および／またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに融合されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であり、前記Ｄｎａ２ポリペプチドが、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＤｎａ２ドメインを含むＤｎａ２融合タンパク質であり、場合によっては、前記標的核酸が、２つ以上のＦＥＮ融合タンパク質および／または２つ以上のＤｎａ２融合タンパク質と接触させられ、それによって、前記ＦＥＮおよび／またはＤｎａ２が前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインおよび前記標的核酸に動員される、請求項１から３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパクであり、前記ＦＥＮが、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＦＥＮドメインを含むＦＥＮ融合タンパク質であり、および／またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに融合されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であり、前記Ｄｎａ２ポリペプチドが、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＤｎａ２ドメインを含むＤｎａ２融合タンパク質であり、場合によっては、前記標的核酸が、２つ以上のＦＥＮ融合タンパク質および／または２つ以上のＤｎａ２融合タンパク質と接触させられ、それによって、前記ＦＥＮおよび／またはＤｎａ２が前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインおよび前記標的核酸に動員される、請求項１から３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４２】
前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）ドメイン、Ｃａｓ１２ｂ（Ｃ２ｃ１）ドメイン、Ｃａｓ１２ｃ（Ｃ２ｃ３）ドメイン、Ｃａｓ１２ｄ（ＣａｓＹ）ドメイン、Ｃａｓ１２ｅ（ＣａｓＸ）ドメイン、Ｃａｓ１２ｇドメイン、Ｃａｓ１２ｈドメイン、Ｃａｓ１２ｉドメイン、Ｃ２ｃ４ドメイン、Ｃ２ｃ５ドメイン、Ｃ２ｃ８ドメイン、Ｃ２ｃ９ドメイン、Ｃ２ｃ１０ドメイン、Ｃａｓ１４ａドメイン、Ｃａｓ１４ｂドメイン、および／もしくはＣａｓ１４ｃドメイン、または前記ＩＩ

型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、Ｃａｓ９ドメインであり、場合によっては、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質および／または前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパクが、本明細書に記載の１つまたは複数の変異を含む、請求項１から４１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４３】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、配列番号９のアミノ酸位置番号付けを参照してＲ１１３８Ａ変異を含むＬｂＣａｓ１２ａニッカーゼ、配列番号２のアミノ酸位置番号付けを参照してＲ１２２６Ａ変異を含むＡｓＣａｓ１２ａニッカーゼ、配列番号６のアミノ酸位置番号付けを参照してＲ１２２８Ａを含むＦｎＣａｓ１２ａ、または配列番号１４のアミノ酸位置番号付けを参照してＲ１２４１Ａ変異を含むＰｄＣａｓ１２ａニッカーゼである、請求項４２に記載の方法。

【請求項４４】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、アシダミノコッカス属に由来するＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（ＡｓＣａｓ１２ａ）もしくはラクノスピラ科細菌に由来するＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、ＬｂＣａｓ１２ａ）、またはそれらに由来する修飾Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質である、請求項４２に記載の方法。

【請求項４５】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ブチリビブリオ・ヒュンガティに由来するＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（ＢｈＣａｓ１２）またはそれに由来する修飾Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質である、請求項４２に記載の方法。

【請求項４６】

前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、Ｃａｓ９エフェクタータンパク質／ドメインであり、場合によっては連鎖球菌由来のＣａｓ９エフェクタータンパク質／ドメインである、請求項４２に記載の方法。

【請求項４７】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、低減した一本鎖ＤＮＡ切断活性（ｓｓＤＮアーゼ活性）を含むか、またはｓｓＤＮアーゼ活性を低減（もしくは排除）するように修飾（変異）されている、請求項１から４０または４２から４６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４８】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、自己処理ＲＮＡｓｅ活性を低減（または排除）するように修飾（変異）されている、請求項１から４０または４２から４７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４９】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、配列番号１のアミノ酸位置番号付けを参照してＨ７５９Ａ変異を有するＣａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質である、請求項４８に記載の方法。

【請求項５０】

Ｈ７５９Ａ変異を有する前記Ｃａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、配列番号１４８のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む、請求項４９に記載の方法。

【請求項５１】

Ｈ７５９Ａ変異を有する前記Ｃａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、配列番号１４８のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するＬｂＣａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質である、請求項５０に記載の方法。

【請求項５２】

不活化したＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質または不活化したＩＩ型

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、ｄｅａｄＣａｓ（ｄＣａｓ、ｄＣａｓ１２ａ、ｄＣａｓ９））を生成するために、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ヌクレアーゼ活性を低減または排除するように修飾されている（例えば、ヌクレアーゼ活性部位（例えば、ＲｕｖＣドメイン）における変異）、または前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ヌクレアーゼ活性を低減または排除するように修飾されている（例えば、ヌクレアーゼ活性部位（例えば、ＲｕｖＣまたはＨＮＨドメイン）における変異）、請求項１から５１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５３】

前記不活化したＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質または前記不活化したＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ニッカーゼ活性を含む、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

前記不活化したＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質または前記不活化したＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ニッキング酵素（例えば、Ｆｏｋ１、ＢＦｉ１、例えば、操作されたＦｏｋ１またはＢＦｉＩ）に融合されている、請求項５２または請求項５３に記載の方法。

【請求項５５】

Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＤＮＡ結合親和性を低減させるアミノ酸修飾を含む、請求項１から５４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５６】

前記修飾が、アミノ酸置換である、請求項５５に記載の方法。

【請求項５７】

前記修飾がアラニンへのアミノ酸置換であり、場合によっては前記アラニンが正に荷電したアミノ酸残基を置換する、請求項５５または請求項５６に記載の方法。

【請求項５８】

前記アミノ酸置換が、配列番号１４８のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｋ１６７Ａ、Ｋ２７２Ａ、および／またはＫ３４９Ａである、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、配列番号１４８のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｋ１６７Ａ、Ｋ２７２Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ１６７Ａ＋Ｋ２７２Ａ、Ｋ１６７Ａ＋Ｋ３４９Ａ、Ｋ２７２Ａ＋Ｋ３４９Ａ、またはＫ１６７Ａ＋Ｋ２７２Ａ＋Ｋ３４９Ａのアミノ酸置換を含むＣＡＳ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質であり、場合によっては前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質がＬｂＣａｓ１２ａである、請求項５８に記載の方法。

【請求項６０】

逆転写酵素が、アミノ酸修飾を含む、請求項１から５９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６１】

アミノ酸修飾が、アミノ酸置換である、請求項６０に記載の方法。

【請求項６２】

前記アミノ酸置換が、配列番号１７２のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｗ３８８Ｒ、Ｅ６０７Ｋ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｆ１５５Ｙ、Ｈ６３８Ｇ、Ｑ２２１Ｒ、Ｖ２２３Ｍおよび／またはＤ５２４Ｎである、請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】

逆転写酵素が、配列番号１７２のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｗ３８８Ｒ、およびＥ６０７Ｋ；Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｗ３８８Ｒ、およびＥ６０７Ｋ；５Ｍ（Ｔ３５５Ａ／Ｑ３５７Ｍ／Ｋ３５８Ｒ／Ａ３５９Ｇ／Ｓ３６０Ａ）、Ｆ１５５Ｙ、およびＨ６３８Ｇ；５Ｍ（Ｔ３５５Ａ／Ｑ３５７Ｍ／Ｋ３５８Ｒ／Ａ３５９Ｇ／Ｓ３６０Ａ）、Ｑ２２１Ｒ、およびＶ２２３Ｍ；または５

Ｍ　Ｔ３５５Ａ／Ｑ３５７Ｍ／Ｋ３５８Ｒ／Ａ３５９Ｇ／Ｓ３６０Ａ）およびＤ５２４Ｎのアミノ酸置換を含む、請求項６１または請求項６２に記載の方法。

【請求項６４】

前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、逆転写酵素に融合されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質である、または前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、逆転写酵素に融合されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質である、請求項１から６３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６５】

前記逆転写酵素が、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓエフェクターポリペプチドまたはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓエフェクターポリペプチドのＣ末端に融合されている、請求項６４に記載の方法。

【請求項６６】

前記逆転写酵素が、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドまたは前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓエフェクターポリペプチドのＮ末端に融合されている、請求項６５に記載の方法。

【請求項６７】

前記逆転写酵素が、１つまたは複数の一本鎖ＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）に融合され、それによって前記逆転写酵素の熱安定性、処理能力および鋳型親和性が改善されている、請求項１から６６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６８】

前記１つまたは複数の一本鎖ＲＮＡ結合ドメインが、前記逆転写酵素のＮ末端に融合されており、場合によっては前記逆転写酵素が、そのＣ末端で前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質および／または前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＮ末端にさらに融合されている、請求項６７に記載の方法。

【請求項６９】

前記標的核酸を５’－３’エキソヌクレアーゼと接触させることをさらに含む、請求項１から６８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７０】

前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に、場合によってはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質に融合されている、または前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に、場合によってはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質に融合されている、請求項６９に記載の方法。

【請求項７１】

前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＣ末端に、場合によっては前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質のＣ末端に融合されている、または前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＣ末端に、場合によっては前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質のＣ末端に融合されている、請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】

前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ペプチドタグに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であり、前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質である、請求項６９に記載の方法。

【請求項７３】

前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ペプチドタグと結合できる親和性ポリペプチドに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であり、前記ＩＩ型または

Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質である、請求項６９に記載の方法。

【請求項７４】

前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ＲＮＡ動員モチーフに結合できる親和性ポリペプチドに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であり、前記拡張ガイド核酸が、ＲＮＡ動員モチーフに連結されている、請求項６９に記載の方法。

【請求項７５】

前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ＲｅｃＥエキソヌクレアーゼ（ＲｅｃＥ）、ＲｅｃＪエキソヌクレアーゼ（ＲｅｃＪ）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ（Ｔ５＿Ｅｘｏ）、Ｔ７エキソヌクレアーゼ（Ｔ７＿Ｅｘｏ）、ラムダエキソヌクレアーゼ（Ｌａｍｂｄａ＿ｅｘｏ）、ｓｂｃＢ（エキソデオキシリボヌクレアーゼ）、またはｈＥｘｏ１（ヒトエキソヌクレアーゼ１）である、請求項６９から７４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７６】

前記標的核酸を一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ｓｓＤＮＡ結合タンパク質）と接触させることをさらに含む、請求項１から７５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７７】

前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、ＩＩＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されている、請求項７６に記載の方法。

【請求項７８】

前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＣ末端に融合されている、請求項７７に記載の方法。

【請求項７９】

前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＮ末端に融合されている、請求項７７に記載の方法。

【請求項８０】

前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、ヒト、細菌またはファージに由来する、請求項７６から７９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８１】

前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、ｈＲａｄ５１（場合によってはｈＲａｄ５１＿Ｓ２０８Ｅ＿Ａ２０９Ｄ）、ｈＲａｄ５２、ＢｓＲｅｃＡ、ＥｃＲｅｃＡ、Ｔ４ｓｓＢおよび／またはＢｒｅｘ２７である、請求項７６から８０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８２】

非相同末端結合（ＮＨＥＪ）の化学的阻害剤を導入することによって、ＮＨＥＪタンパク質を標的化するＣＲＩＳＰＲガイド核酸またはｓｉＲＮＡを導入してＮＨＥＪタンパク質の発現を一過的にノックダウンすることによって、またはＮＨＥＪを防ぐポリペプチドを導入することによって、二本鎖切断を低減させることをさらに含む、請求項１から８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８３】

ＮＨＥＪを防ぐ前記ポリペプチドが、前記逆転写酵素および／または前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されており、場合によってはＮＨＥＪを防ぐ前記ポリペプチドが、前記逆転写酵素および／または前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＮ末端に融合されている、請求項８２に記載の方法。

【請求項８４】

ＮＨＥＪを防ぐ前記ポリペプチドが、Ｇａｍタンパク質である、請求項８２または請求項８３に記載の方法。

【請求項８５】

前記Ｇａｍタンパク質が、エシェリヒアファージＭｕ　Ｇａｍタンパク質であり、場合によっては前記Ｇａｍタンパク質が、配列番号１４７のアミノ酸配列を含む、請求項８４

に記載の方法。
【請求項８６】
前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ポリヌクレオチドによってコードされており、および／または前記逆転写酵素が、ポリヌクレオチドによってコードされている、請求項１から８５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８７】
前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ポリヌクレオチドによってコードされている、請求項３２から８６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
前記５’フラップエンドヌクレアーゼ（ＦＥＮ）が、ポリヌクレオチドによってコードされている、請求項３７から８７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８９】
前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ポリヌクレオチドによってコードされている、請求項６９から８８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９０】
前記標的核酸が、細胞中、無細胞系中、またはウイルス中にある、請求項１から８９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９１】
前記細胞が、真核細胞または原核細胞である、請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】
前記細胞が、動物、植物、真菌、古細菌、細菌またはウイルス由来である、請求項９０または請求項９１に記載の方法。
【請求項９３】
前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドおよび／または前記逆転写酵素をコードする前記ポリヌクレオチドが、同一または別個の発現カセット中に含まれており、場合によっては、前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドと前記逆転写酵素をコードする前記ポリヌクレオチドが、同じ発現カセット中に含まれている場合、前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドおよび前記逆転写酵素をコードする前記ポリヌクレオチドは、単一のプロモーターに、または任意の組合せで２つ以上の別個のプロモーターに作動可能に連結されている、請求項８６から９２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９４】
前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、発現カセット中に含まれており、場合によっては前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項８７から９３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９５】
前記同一または別個の発現カセットが、同一または別個のベクター中に含まれている、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
前記発現カセットが、ベクターに含まれている、請求項９４に記載の方法。
【請求項９７】
前記５’フラップエンドヌクレアーゼをコードする前記ポリヌクレオチドが、発現カセット中に含まれており、場合によっては前記発現カセットが、ベクター中に含まれている、請求項８８から９６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９８】
前記５’－３’エキソヌクレアーゼをコードする前記ポリヌクレオチドが、発現カセット中に含まれており、場合によっては前記発現カセットが、ベクター中に含まれている、請求項８３から９１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項９９】
前記拡張ガイド核酸が、発現カセット中に含まれており、場合によっては前記発現カセットが、ベクター中に含まれている、請求項１から９８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１００】
前記ガイド核酸が、発現カセット中に含まれており、場合によっては前記発現カセットが、ベクター中に含まれている、請求項３２から９９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０１】
前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド、前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、前記逆転写酵素、前記５’フラップエンドヌクレアーゼ、前記５’－３’エキソヌクレアーゼならびにそれを含む発現カセットおよび／もしくはベクターが、生物、場合によっては原核生物もしくは真核生物、場合によっては動物、植物、真菌、古細菌、細菌またはウイルス中における発現のためにコドン最適化されている、請求項８５から１００のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０２】
前記コドン最適化が、双子葉植物における発現のためのものである、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０３】
前記コドン最適化が、単子葉植物における発現のためのものである、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０４】
第１の部位で標的核酸を
（ａ）（ｉ）第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；および
（ｉｉ）第１の拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ）；ならびに
（ｂ）（ｉ）第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、
（ｉｉ）第１の逆転写酵素；および
（ｉｉ）第１のガイド核酸
と接触させること
を含み、それによって前記標的核酸を修飾する、標的核酸を修飾する方法。
【請求項１０５】
前記第１の拡張ガイド核酸が、
（ａ）ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ｃｒＲＮＡ、ｃｒＤＮＡ）；ならびに
（ｂ）プライマー結合部位および逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）を含む拡張部分
を含む、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
前記第１の拡張ガイド核酸の前記ＣＲＩＳＰＲ核酸が、前記標的核酸の第１の鎖上の第１の部位に結合できる（実質的な相同性を有する）スペーサー配列を含む、請求項１０４または請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記第１のガイド核酸が、ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ｃｒＲＮＡ、ｃｒＤＮＡ）を含む、請求項１０４から１０６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０８】
前記第１のガイド核酸の前記ＣＲＩＳＰＲ核酸が、前記標的核酸の前記第１の鎖上の前記第１の部位の上流にある、前記標的核酸の前記第１の鎖上の第２の部位に結合するスペーサー配列を含む、請求項１０７に記載の方法。
【請求項１０９】
前記第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、前記逆転写酵素に融合さ

れたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質である、請求項１０４から１０８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１０】
前記第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに融合されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であり、前記第１の逆転写酵素が、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合された逆転写酵素ドメインを含む逆転写酵素融合タンパク質である、請求項１０４から１０８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１１】
前記第１のガイド核酸が、ＲＮＡ動員モチーフに連結されており、前記第１の逆転写酵素が、前記ＲＮＡ動員モチーフに結合できる親和性ポリペプチドに融合された逆転写酵素ドメインを含む逆転写酵素融合タンパク質である、請求項１０４から１０８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１２】
前記標的核酸を
（ａ）第３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；および
（ｂ）第２のガイド核酸
と接触させることをさらに含み、ここで、前記第３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質によってニッキングされた第２の鎖上の第２の部位から約１０から約１２５塩基対（５’または３’のいずれか）に位置する前記標的核酸の第１の鎖上の部位をニッキングし、それによってミスマッチ修復を改善する、請求項１０４から１１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１３】
前記標的核酸を５’－３’エキソヌクレアーゼと接触させることをさらに含む、請求項１０４から１１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１４】
前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されている、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１５】
前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、前記第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＣ末端に融合されている、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ペプチドタグに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であり、前記第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質である、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１７】
前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ペプチドタグと結合できる親和性ポリペプチドに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であり、前記第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに融合されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質である、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１８】
前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ＲＮＡ動員モチーフに結合できる親和性ポリペプチドに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であり、拡張ガイド核酸が、ＲＮＡ動員モチーフに連結されている、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１９】
前記５’－３’エキソヌクレアーゼが、ＲｅｃＥエキソヌクレアーゼ（ＲｅｃＥ）、ＲｅｃＪエキソヌクレアーゼ（ＲｅｃＪ）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ（Ｔ５＿Ｅｘｏ）、Ｔ７

エキソヌクレアーゼ（Ｔ７＿Ｅｘｏ）、ラムダエキソヌクレアーゼ（Ｌａｍｂｄａ＿ｅｘｏ）、ｓｂｃＢ（エキソデオキシリボヌクレアーゼ）、またはｈＥｘｏ１（ヒトエキソヌクレアーゼ１）である、請求項１１３から１１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２０】

前記標的核酸を

（ａ）第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；

（ｂ）第２の逆転写酵素、および

（ｃ）第２の拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ）

と接触させることをさらに含み、ここで、前記第２の拡張ガイド核酸は、前記標的核酸の第１の鎖上の部位を標的化し（スペーサーが前記標的核酸の第１の鎖上の部位に実質的に相補的であり／結合し）、それによって前記標的核酸を修飾する、請求項１０４から１１９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２１】

前記第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、前記第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、前記第３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、および／または前記第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、任意の組合せで、Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質である、請求項１０４から１２０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２２】

前記標的核酸を

（ａ）第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、場合によってはＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；

（ｂ）第２の逆転写酵素、および

（ｃ）第２の拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ）、

と接触させることをさらに含み、ここで、前記第２の拡張ガイド核酸は、前記標的核酸の第１の鎖（標的鎖）または第２の鎖（非標的鎖）上の部位を標的化し（スペーサーが前記標的核酸の第１の鎖（標的鎖）または第２の鎖（非標的鎖）上の部位に実質的に相補的であり／結合し）、それによって前記標的核酸を修飾する、請求項１から１０３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２３】

前記第１および／または第２の拡張ガイド核酸が、さらにシュードノットを含む、請求項１０４から１２２に記載の方法。

【請求項１２４】

前記シュードノットが、前記拡張ガイド核酸の３’末端に位置している、請求項１２３に記載の方法。

【請求項１２５】

前記シュードノットが、配列番号１５８の核酸配列を含むｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットまたは配列番号１９１の核酸配列を含むＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットである、請求項１２３または請求項１２４に記載の方法。

【請求項１２６】

前記シュードノットが、配列番号９５または配列番号２０３の核酸配列を含む、請求項１２３または請求項１２４に記載の方法。

【請求項１２７】

前記標的核酸を一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ｓｓＤＮＡ結合タンパク質）と接触させることをさらに含む、請求項１０４から１２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２８】

前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、第１、第２、第３および／または第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されている、請求項１２７に記載の方法。

【請求項１２９】
前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、第１、第２、第３および／または第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＣ末端に融合されている、請求項１２７または請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、第１、第２、第３および／または第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＮ末端に融合されている、請求項１２７または請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３１】
前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、ヒト、細菌またはファージに由来する、請求項１２７から１３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３２】
前記ｓｓＤＮＡ結合タンパク質が、ｈＲａｄ５１（場合によってはｈＲａｄ５１＿Ｓ２０８Ｅ＿Ａ２０９Ｄ）、ｈＲａｄ５２、ＢｓＲｅｃＡ、ＥｃＲｅｃＡ、Ｔ４ｓｓＢおよび／またはＢｒｅｘ２７である、請求項１２７から１３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３３】
非相同末端結合（ＮＨＥＪ）の化学的阻害剤を導入することによって、ＮＨＥＪタンパク質を標的化するＣＲＩＳＰＲガイド核酸またはｓｉＲＮＡを導入してＮＨＥＪタンパク質の発現を一過的にノックダウンすることによって、またはＮＨＥＪを防ぐポリペプチドを導入することによって、二本鎖切断を低減させることをさらに含む、請求項１０４から１３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３４】
ＮＨＥＪを防ぐ前記ポリペプチドが、前記第１および／もしくは第２の逆転写酵素ならびに／または前記第１、第２、第３および／もしくは第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されており、場合によってはＮＨＥＪを防ぐ前記ポリペプチドが、前記第１および／もしくは第２の逆転写酵素ならびに／または前記第１、第２、第３および／もしくは第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＮ末端に融合されている、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３５】
ＮＨＥＪを防ぐ前記ポリペプチドが、Ｇａｍタンパク質である、請求項１３３または請求項１３４に記載の方法。
【請求項１３６】
前記Ｇａｍタンパク質が、エシェリヒアファージＭｕ　Ｇａｍタンパク質であり、場合によっては前記Ｇａｍタンパク質が、配列番号１４７のアミノ酸配列を含む、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１３７】
（ｉ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ核酸もしくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ）、および／またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸もしくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸とｔｒａｃｒ核酸（例えば、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＤＮＡ）；ならびに（ｉｉ）プライマー結合部位および逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）（ＲＴＴ）を含む拡張部分を含む拡張ガイド核酸。
【請求項１３８】
前記拡張ガイド核酸が、シュードノットをさらに含む、請求項１３７に記載の拡張ガイド核酸。
【請求項１３９】
前記シュードノットが、前記拡張ガイド核酸の３’末端に位置している、請求項１３８に記載の拡張ガイド核酸。
【請求項１４０】
前記シュードノットが、配列番号１５８の核酸配列を含むｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュード

ノットまたは配列番号１９１の核酸配列を含むＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットである、請求項１３８または請求項１３９に記載の拡張ガイド核酸。
【請求項１４１】
前記シュードノットが、配列番号９５または配列番号２０３の核酸配列を含む、請求項１３８または請求項１３９に記載の拡張ガイド核酸。
【請求項１４２】
発現カセット中に含まれており、場合によっては前記発現カセットが、ベクター中に含まれている、請求項１３７から１４１のいずれか１項に記載の拡張ガイド核酸。
【請求項１４３】
（ａ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；
（ｂ）逆転写酵素、および
（ｃ）拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ）
を含む複合体。
【請求項１４４】
前記拡張ガイド核酸が、シュードノットをさらに含む、請求項１４３に記載の複合体。
【請求項１４５】
前記シュードノットが、前記拡張ガイド核酸の３’末端に位置している、請求項１４４に記載の複合体。
【請求項１４６】
前記シュードノットが、配列番号１５８の核酸配列を含むｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットまたは配列番号１９１の核酸配列を含むＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットである、請求項１４４または請求項１４５に記載の複合体。
【請求項１４７】
前記シュードノットが、配列番号９５または配列番号２０３の核酸配列を含む、請求項１４４または請求項１４５に記載の複合体。
【請求項１４８】
前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質である、請求項１４３から１４７に記載の複合体。
【請求項１４９】
前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質である、請求項１４３から１４７に記載の複合体。
【請求項１５０】
前記ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が、ＲＮＡ動員モチーフに結合できる親和性ポリペプチドに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質である、請求項１４３から１４７に記載の複合体。
【請求項１５１】
前記逆転写酵素が、ペプチドタグに融合された逆転写酵素ドメインを含む融合タンパク質である、請求項１４３から１５０のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項１５２】
前記逆転写酵素が、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合された逆転写酵素ドメインを含む融合タンパク質である、請求項１４３から１５０のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項１５３】
前記逆転写酵素が、ＲＮＡ動員ポリペプチドを結合できる親和性ポリペプチドに融合さ

れた逆転写酵素ドメインを含む融合タンパク質である、請求項１４３から１５０のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項１５４】
発現カセット中に含まれており、場合によっては前記発現カセットが、ベクター中に含まれている、請求項１４３から１５３のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項１５５】
生物中における発現のためにコドン最適化された発現カセットであって、５’から３’の向きに、
（ａ）プロモーター配列をコードするポリヌクレオチド、
（ｂ）生物中における発現のためにコドン最適化されているＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）、ｄＣａｓ１２ａなど）またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９、ｄＣａｓ９など）をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）リンカー配列；ならびに
（ｄ）生物中での発現のためにコドン最適化されている逆転写酵素をコードするポリヌクレオチド
を含む発現カセット。
【請求項１５６】
前記生物が、動物、植物、真菌、古細菌、細菌またはウイルスである、請求項１５５に記載の発現カセット。
【請求項１５７】
前記生物が植物であり、前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、植物における発現のためにコドン最適化されており、前記プロモーター配列が、植物特異的プロモーター配列（例えば、ＺｍＵｂｉ１、ＭｔＵｂ２、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩ））である、請求項１５６に記載の発現カセット。
【請求項１５８】
前記逆転写酵素が、１つまたは複数のｓｓＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）に融合されている、請求項１５５から１５７のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項１５９】
前記１つまたは複数の一本鎖ＲＮＡ結合ドメインが、前記逆転写酵素のＮ末端に融合されており、場合によっては前記逆転写酵素が、そのＣ末端で前記ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質および／または前記Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＮ末端にさらに融合されている、請求項１５８に記載の方法。
【請求項１６０】
前記リンカーが、アミノ酸またはペプチドリンカーである、請求項１５５から１５９のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項１６１】
前記ペプチドリンカーの長さが、約２から約１００アミノ酸（残基）である、請求項１６０に記載の発現カセット。
【請求項１６２】
前記ペプチドリンカーが、ＧＳリンカーである、請求項１６０または請求項１６１に記載の発現カセット。
【請求項１６３】
植物における発現のためにコドン最適化された発現カセットであって、
（ａ）植物特異的プロモーター配列（例えば、ＺｍＵｂｉ１、ＭｔＵｂ２）をコードするポリヌクレオチド、および
（ｂ）拡張ガイド核酸であって、前記拡張ガイド核酸が、その３’末端にプライマー結合部位および標的核酸に組み込まれる編集部を含む拡張部分を含み（例えば、逆転写酵素の鋳型）、場合によっては前記拡張ガイド核酸が発現カセット中に含まれており、場合によっては前記拡張ガイド核酸が、Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターに作動可能に連結されている

、拡張ガイド核酸
を含む発現カセット。
【請求項１６４】
前記拡張ガイド核酸が、シュードノットをさらに含む、請求項１６３に記載の発現カセット。
【請求項１６５】
前記シュードノットが、前記拡張ガイド核酸の３’末端に位置している、請求項１６４に記載の発現カセット。
【請求項１６６】
前記シュードノットが、配列番号１５８の核酸配列を含むｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットまたは配列番号１９１の核酸配列を含むＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットである、請求項１６４または請求項１６５に記載の発現カセット。
【請求項１６７】
前記シュードノットが、配列番号９５または配列番号２０３の核酸配列を含む、請求項１６４または請求項１６５に記載の発現カセット。
【請求項１６８】
前記植物特異的プロモーターが、イントロンと結合しているか、またはイントロンを含むプロモーター領域（例えば、イントロンを含むＺｍＵｂｉ１；イントロンを含むＭｔＵｂ２）である、請求項１５７から１６７のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項１６９】
前記コドン最適化が、双子葉植物における発現のためのものである、請求項１５６から１６８のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項１７０】
前記コドン最適化が、単子葉植物における発現のためのものである、請求項１５６から１６８のいずれか１項に記載の発現カセット。
【請求項１７１】
植物または植物細胞において標的核酸を修飾する方法であって、請求項１５５から１７０のいずれか１項に記載の発現カセットを植物または植物細胞に導入することを含み、それによって植物または植物細胞において標的核酸を修飾する方法。
【請求項１７２】
前記修飾された標的核酸を含む植物を生成するために、前記修飾された標的核酸を含む植物細胞を再生させることをさらに含む、請求項１７１に記載の方法。
【請求項１７３】
前記接触させることが、約２０℃から４２℃の温度で行われる、請求項１から１３２、１７１、または１７２のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表の電子ファイルに関する陳述
３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．８２１に従って提出した、表題１４９９．５７．ＷＯ＿ＳＴ２５．ｔｘｔの、１，０４３，３６２バイトのサイズの、２０２１年１１月５日に作成した、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出したＡＳＣＩＩテキストフォーマットの配列表を、紙コピーの代わりに提供する。この配列表は、その開示について、参照によって本明細書中に組み込まれる。
【０００２】
優先権の陳述
本出願は、３５Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１９（ｅ）に従って、２０２０年１１月６日出願の米国仮特許出願第６３／１１０，３８６号の利益を主張し、この出願の全体の内容は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。
【０００３】

本発明の分野
本発明は、植物において核酸を修飾するためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、逆転写酵素および拡張ガイド核酸を含む組換え核酸構造体およびその使用方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
塩基編集は、シトシン残基とアデニン残基をそれぞれチミンとグアニンに変更する効率的な方法であることが示されている。これらのツールは強力ではあるが、バイスタンダー塩基、ＰＡＭ密度の高い酵素が補償のために利用可能でない限り形質関連標的へのアクセスの制限をもたらす小さな塩基編集ウィンドウ、シトシンとアデニンを他の残基にそれぞれ変換する能力の制限、そしてチミンまたはグアニン残基を編集する能力がないことなど、いくつかの制限がある。このように、現在、塩基編集に利用可能なツールは限られている。そのため、より多くの生物に対して可能な編集の幅を広げて核酸編集をより有用なものにするためには、新たな編集ツールが必要である。
【発明の概要】
【０００５】
第１の態様においては、標的核酸を（ａ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；（ｂ）逆転写酵素、ならびに（ｃ）拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ）に接触させることを含み、それによって標的核酸を修飾する、標的核酸を修飾する方法が提供される。
【０００６】
第２の態様においては、第１の部位で標的核酸を（ａ）（ｉ）第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；および（ｉｉ）第１の拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ）；ならびに（ｂ）（ｉ）第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、（ｉｉ）第１の逆転写酵素；および（ｉｉ）第１のガイド核酸と接触させることを含み、それによって標的核酸を修飾する、標的核酸を修飾する方法が提供される。
【０００７】
第３の態様においては、本発明の発現カセットを植物または植物細胞に導入することを含み、それによって植物または植物細胞において標的核酸を修飾し、修飾された標的核酸を含む植物または植物細胞を生成する、植物または植物細胞において標的核酸を修飾する方法が提供される。
【０００８】
第４の態様においては、（ａ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；（ｂ）逆転写酵素、および（ｃ）拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ、例えば、標的化対立遺伝子ガイド（タグ）核酸（すなわち、ｔａｇＤＮＡ、ｔａｇＲＮＡ））を含む複合体が提供される。
【０００９】
第５の態様においては、５’から３’の向きに（ａ）植物特異的プロモーター配列をコードするポリヌクレオチド（例えば、ＺｍＵｂｉ１、ＭｔＵｂ２、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩ））、（ｂ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）、ｄＣａｓ１２ａなど）をコードする植物コドン最適化ポリヌクレオチド；（ｃ）リンカー配列；ならびに（ｄ）逆転写酵素をコードする植物コドン最適化ポリヌクレオチドを含む、生物における発現のためにコドン最適化された発現カセットが提供される。
【００１０】
第６の態様においては、（ａ）プロモーター配列をコードするポリヌクレオチド、なら

びに（ｂ）拡張ＲＮＡガイド配列を含む、生物における発現のためにコドン最適化された発現カセットであって、ここで、前記拡張ガイド核酸は、その３’末端にプライマー結合部位および標的核酸に組み込まれる編集部を含む拡張部分を含み（例えば、逆転写酵素の鋳型）、場合によっては拡張ガイド核酸が発現カセットに含まれており、場合によっては拡張ガイド核酸がＰｏｌ　ＩＩプロモーターに作動可能に連結されている、発現カセットが提供される。

【００１１】

本発明はさらに、本発明の方法により修飾された標的核酸を含む植物細胞、細菌細胞、古細菌細胞、真菌細胞、動物細胞を含む細胞、ならびに前記細胞を含む植物、細菌、古細菌、真菌、および動物を含む生物を提供する。さらに、本発明は、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および発現カセットを含むキットを提供する。

【００１２】

本発明のこれらおよび他の態様は、以下の本発明の説明においてより詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】図１は、ｃｒＲＮＡの逆転写によるＤＮＡ配列の生成と、その後のニック部位への組込みを示す模式図である。拡張ガイドｃｒＲＮＡ（ｔａｇＲＮＡ）は、Ｃｐｆ１ニッカーゼ（ｃａｓ１２ａニッカーゼ）（ｎＣｐｆ１、左上）と結合する。あるいは、編集鋳型をコードする拡張部は、ｃｒＲＮＡの５’に位置していてもよい。ｃｒＲＮＡの３’末端は、ニック部位でＤＮＡに相補的である（非太字の対合線、左上）。ｎＣｐｆ１は逆転写酵素（ＲＴ）と共有結合しているか、ＲＴがｎＣｐｆ１に動員されていてもよく、その場合、複数の逆転写酵素タンパク質がｎＣｐｆ１に動員されていてもよい。ＲＴは、第２鎖上のＤＮＡニックの３’末端からＤＮＡを重合して、ゲノムに非相補的なヌクレオチド（太字の対合線、波括弧、右上）に続いて、相補的なヌクレオチド（非太字の対合線、右上）を持つｃｒＲＮＡに相補的なＤＮＡ配列を生成する。解離すると、結果として生じるＤＮＡは、３’オーバーハングを有する伸長されたｓｓＤＮＡを持ち、これは、元のＤＮＡ（非太字の対合線、右下）とほぼ同じ配列であるが、いくつかの非ネイティブのヌクレオチド（太字の対合線、波括弧、右下）を有している。このフラップは、ＤＮＡにミスマッチのヌクレオチドが組み込まれた５’オーバーハングを有する構造（左下）と平衡状態にある。ミスマッチ修復の低減、修復および複製の際の５’フラップの除去によって、また、本明細書中に記載されているように第１鎖のニッキングによっても、平衡は左の構造に向かい得る。

【図２】図２は、ミスマッチ修復を低減する方法を示す模式図である。修飾されたヌクレオチド（太字、波括弧）を有する最終生成物の形成にさらに有利な平衡状態を推進するために、ニッカーゼが、ＲＴ－編集領域（稲妻）の外側の領域－第２鎖（例えば、標的鎖または上の鎖）のニックから離れた距離で、標的核酸の第１鎖（例えば、標的鎖または下の鎖）を切断するように（ガイド核酸を介して）導かれる。ｎＣｐｆ１：ｃｒＲＮＡ分子は、編集バブルのどちらか一方の側にあっても、両側にあってもよい。第１の鎖（破線）をニッキングすることは、ミスマッチ修復および複製の際に新たに組み込まれたヌクレオチドが正しいヌクレオチドであることを細胞に示し、したがって、新たなヌクレオチドを有する最終生成物に有利となる。所望の生成物に向けて平衡を保つための他の可能な方法は、５’フラップの除去を含み得る。

【図３】図３は、本発明の組成物を用いた核酸修飾の代替的な方法を示すものであり、ここでは、２つのニックが第２鎖に導入され、ＲＴによって導入された配列が、二重にニッキングされたＷＴ配列に置き換わり、それによって、より効率的にゲノムに組み込まれる。

【図４】ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８Ａは、１％　ＴＡＥ－アガロースゲル上で分解され、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで実証されているようにニッカーゼである。野生型ＬｂＣａｓ１２ａによって二本鎖切断が生じるまでは（レーン３）、スーパーコイル化した２．８ｋＢの

プラスミドが２．０ｋＢの見かけのサイズで泳動した（レーン２）。
【図５】図５は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で試験したＲＥＤＲＡＷエディタの構成を示している（実施例１を参照）。
【図６】図６は、第１のライブラリで試験したｔａｇＲＮＡのコンフォメーションを示している。
【図７】図７は、ＲＥＤＲＡＷ編集で使用するために設計されたヘアピン配列の例（配列番号２０３）の構造である。
【図８】図８は、機能停止したａａｄＡ遺伝子において抗生物質耐性を回復させたＴＧＡ＞ＣＴＧ編集を実証したサンガー配列決定の結果を示している（配列番号２０４～２０８）。編集は、ＳＶ４０－ＭＭＬＶ－ＲＴ－ＸＴＥＮ－ｎＬｂＣａｓ１２ａ－ＳＶ４０のタンパク質構成で、セレクション１０のコロニーから観察された（配列番号７１）。
【図９】図９は、抗生物質ストレプトマイシンに対する耐性を付与する、大腸菌ゲノムのｒｐｓＬ遺伝子におけるＡＡＡ＞ＣＧＴ編集を示すサンガー配列決定の結果である（配列番号２０９～２１１）。編集は、ＳＶ４０－ＭＭＬＶ－ＲＴ－ＸＴＥＮ－ｎＲＶＲＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）－ＳＶ４０のタンパク質構成で、セレクション２．５のコロニーから観察された（配列番号７９）。
【図１０】図１０は、機能停止したａａｄＡ遺伝子において抗生物質耐性を回復させたＴＧＡ＞ＧＡＴ編集を実証したサンガー配列決定の結果を示している（配列番号２１２～２１５）。編集は、ＳＶ４０－ｎＬｂＣａｓ１２ａ－ＸＴＥＮ－ＭＭＬＶ－ＲＴ－ＳＶ４０のタンパク質構成で、セレクション２．２５のコロニーから観察された（配列番号７３）。
【図１１】図１１は、機能停止したａａｄＡ遺伝子において抗生物質耐性を回復させたＴＧＡ＞ＧＡＴ編集を実証したサンガー配列決定の結果を示している（配列番号２１２～２１５）。編集は、ＳＶ４０－ＭＭＬＶ－ＲＴ－ＸＴＥＮ－ｎＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）－ＳＶ４０のタンパク質構成で、セレクション２．３１のコロニーから観察された（配列番号８３）。
【図１２】図１２は、ヒトの細胞で実施される編集方法の一例を示している（実施例２を参照）。パネルＡは、二本鎖の標的核酸を示している。Ｃａｓ１２ａ複合体（複合体は、図示していない拡張ガイド核酸を含む）は、第１鎖（標的鎖、ボトム鎖）に動員され、第２鎖（トップ鎖、非標的鎖）には、場合によっては５’－３’エキソヌクレアーゼにより除去される５’フラップがある（パネルＢ）。パネルＣは、逆転写酵素ＭＭｕＬＶ－ＲＴ（５Ｍ）（配列番号５３）が、標的核酸上のプライミング部位またはプライマー（プライマー結合部位に相補的）から伸長する（破線＝伸長部）ことを示している。パネルＤおよびＥは、ミスマッチ修復およびＤＮＡライゲーションによるＤＮＡ中間体の解消と、編集された新たなＤＮＡ鎖の生成を示している。
【図１３】図１３は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において、ＦＡＮＣＦ１部位において様々なガイドのコンフォメーションを用いた精密な編集を示している。構築体の名称はＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）＋ＲＴ（５Ｍ）＋ＲｅｃＥ　ＦＡＮＣＦ１である。
【図１４】図１４は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において、ＤＭＮＴ１部位において様々なガイドのコンフォメーションを用いた精密な編集を示している。構築体の名称はＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）＋ＲＴ（５Ｍ）である。
【図１５】図１５は、ＤＭＮＴ１部位における精密な編集活性（エキソヌクレアーゼ処理なしに対して正規化；ｐＵＣ１９＝１）に対するエキソヌクレアーゼトランスフェクションの効果を示している。
【図１６】図１６は、ＲＥＤＲＡＷアーキテクチャ（すなわち、本発明の構築体）の様々な形態と、それぞれの精密編集の割合を示している。左のパネルは、トランス（動員なし）で提供される逆転写酵素（ＲＴ）を示している。中央のパネルは、一例として、ＬｂＣｐｆ１（ＬＢＣａｓ１２ａ）のＣ末端に融合されたＳｕｎＴａｇ（例えば、ＧＣＮ４、例えば、配列番号２３）（ＬＢＣｐｆ１－ＳｕｎＴａｇ）を使用したＲＴの動員を示しており、これはＲＴ（５Ｍ）のＮ末端に融合した抗体（ｓｃＦｖ－ＲＴ（５Ｍ））（例えば、

ｓｃＦｖ、配列番号２５）を動員することができる。右のパネルは、ＲＴとｌｂＣｐｆ１の融合タンパク質を示している。右のパネルの左側は、ＬｂＣｐｆ１のＣ末端にＲＴを融合させた結果を、右のパネルの右側は、ＬｂＣｐｆ１のＮ末端にＲＴを融合させた結果を示している。

【図１７】図１７は、ＲＥＤＲＡＷプロセス中に生成された二本鎖切断の両端のＤＮＡを分解するための５’－３’エキソヌクレアーゼの使用の概略図を提供している。

【図１８】図１８は、Ｃａｓポリペプチド（ＬｂＣｐｆ１）のＣ末端に融合させた５’－３’エキソヌクレアーゼ（ＲｅｃＥ（配列番号１２９）、ＲｅｃＪ（配列番号１３０）、Ｔ５＿Ｅｘｏ（配列番号１３１）、Ｔ７＿Ｅｘｏ（配列番号１３２））を用いたＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。この構成では、ＲＴ（５Ｍ）（配列番号５３）はトランスで発現される（動員なし）。

【図１９】図１９は、Ｃａｓポリペプチド（ＬｂＣｐｆ１）のＣ末端にそれぞれ融合させた５’－３’エキソヌクレアーゼｓｂｃＢ（配列番号１３４）または５’－３’エキソヌクレアーゼＥｘｏ（配列番号１３５）を用いたＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。ＲＴ（５Ｍ）は、トランスで発現される（動員なし）。

【図２０】図２０は、エキソヌクレアーゼのトランス発現を用いたＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。ＬｂＣｐｆ１およびＲＴは、融合タンパク質として提供される。図２０の右側は、ＬｂＣｐｆ１のＮ末端にＲＴを融合させた結果（ＲＴ（５Ｍ）－ＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ））を示し、図の左側は、ＬｂＣｐｆ１のＣ末端にＲＴを融合した結果（ＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ）－ＲＴ（５Ｍ））を示している。

【図２１】図２１は、ＲＥＤＲＡＷプロセスにおけるＣａｓ１２ａ（ＬｂＣｐｆ１）の例示的な変異のＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合に対する効果を示している。試験した例示的な変異は、Ｋ１６７Ａ、Ｋ２７２Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ１６７Ａ＋Ｋ２７２Ａ、Ｋ１６７Ａ＋Ｋ３４９Ａ、Ｋ２７２Ａ＋Ｋ３４９Ａ、およびＫ１６７Ａ＋Ｋ２７２Ａ＋Ｋ３４９Ａを含んでいた（ＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）配列番号１４８に対する相対位置）。

【図２２】図２２は、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ｓｓＤＮＡ　ＢＰ）の存在下におけるＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。ｓｓＤＮＡ　ＢＰは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチド（例えば、ＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ））、ＲＴ（５Ｍ）およびｔａｇＲＮＡ１の存在下においてトランスで発現させた。この例では、ＲＴおよびＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ）もトランスで発現させた。試験したｓｓＤＮＡ　ＢＰは、ｈＲａｄ５１＿ｓ２０８Ｅ＿Ａ２０９Ｄ、ｈＲａｄ５２、ＢｓＲｅｃＡ、ＥｃＲｅｃＡ、およびＴ４ＳＳＢであった。モックはｓｓＤＮＡ　ＢＰなしである。

【図２３】図２３は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチド（例えば、ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａ）に融合させた場合の、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ｓｓＤＮＡ　ＢＰ）の存在下におけるＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。ｓｓＤＮＡ結合タンパク質（ｈＲａｄ５１、ｈＲａｄ５２、ＢｓＲｅｃＡ、ＥｃＲｅｃＡ、Ｔ４ＳＳＢ、Ｂｒｅｘ２７）をＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ）のＮ末端またはＣ末端に融合させた。ＲＴ（５Ｍ）およびｔａｇＲＮＡはトランスで発現させた。

【図２４】図２４は、ＮＨＥＪを防ぐポリペプチドの存在下においてＲＥＤＲＡＷを実施した場合に生じるインデルの割合に対する効果を示している。この例では、ＮＨＥＪを防ぐポリペプチドは、Ｇａｍタンパク質（ＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａファージＭｕ　Ｇａｍタンパク質）（配列番号１４７）であり、逆転写酵素はネイティブの配列として（例えば、ＲＴ（５Ｍ））、またはＲＴのＮ末端にＧａｍを融合させて（例えば、Ｇａｍ－ＲＴ（５Ｍ））、トランスで発現される。これらの構築体は、ＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）またはそのＮ末端に融合したＧａｍタンパク質を有するＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）（例えば、Ｇａｍ－ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａ）と同時に発現される。

【図２５】図２５は、Ｇａｍタンパク質の存在下におけるＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。Ｇａｍタンパク質は、逆転写酵素との融合タンパク質（Ｎ末端融合；Ｇａｍ－ＲＴ（５Ｍ））および／またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドとの融合タンパク質（例えば、Ｇａｍ－ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａ）として、トランスで

提供される。
【図２６】図２６は、異なる長さのプライマー結合部位（ＰＢＳ）と逆転写酵素鋳型（ＲＴＴ）を使用したＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。上および下のパネルは、２つの異なるスペーサー（上のパネル：ｐｗｓｐ１４３（ＧＣＴＣＡＧＣＡＧＧＣＡＣＣＴＧＣＣＴＣＡＧＣ）（配列番号１３６）、下のパネル：ｐｗｓｐ１３９（ＣＴＧＡＴＧＧＴＣＣＡＴＧＴＣＴＧＴＴＡＣＴＣ）（配列番号１３７）を用いた結果を示している。
【図２７】図２７は、２つの異なる逆転写酵素鋳型（ＲＴＴ）における編集位置に応じた編集の割合を示している。編集部は、各ＲＴＴにおいて位置－１から位置１９まで変動する位置に配置された（番号付けは標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフの番号付けに対するもの）（編集部は太字）。上のパネルのＲＴＴ：ＴＴＴＧＧＣＴＣＡＣＴＣＣＴＧＣＴＣＧＧＴＧＡＡＴＴＴ　配列番号１８７；下のパネルのＲＴＴ：ＴＴＴＣＧＣＧＣＴＴＧＴＴＣＣＡＡＴＣＡＧＴＡＣＧＣＡ　配列番号１８８。
【図２８】図２８は、２つの形態のＣａｓ９、ヌクレアーゼ（Ｃａｓ９）およびニッカーゼ（ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ変異体））を使用したＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。Ｃａｓ９とｎＣａｓ９の両方が、ガイドＲＮＡの３’末端または５’末端のいずれかに延長部を取り付けたｔａｇＲＮＡ（３’延長部または５’延長部と表記）を用いて試験された。ｔａｇＲＮＡ延長部のＲＴＴおよびＰＢＳの長さを変動させ、スペーサーが４つの異なる部位（ｐｗｓｐ１０：ＧＡＧＴＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡ（配列番号１４０）；ｐｗｓｐ６２１：ＧＣＡＴＴＴＴＣＡＧＧＡＧＧＡＡＧＣＧＡ（配列番号１４１）；ｐｗｓｐ１５：ＧＴＣＡＴＣＴＴＡＧＴＣＡＴＴＡＣＣＴＧ（配列番号１４２）；ｐｗｓｐ１１：ＧＧＡＡＴＣＣＣＴＴＣＴＧＣＡＧＣＡＣＣ（配列番号１４３）を標的化した。
【図２９】図２９は、ＢｈＣａｓ１２ｂを用いたＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。ＢｈＣａｓ１２ｂは、ガイドＲＮＡの３’末端または５’末端（３’または５’と表記）に延長部を取り付けたｔａｇＲＮＡを用いて試験された。ｔａｇＲＮＡ延長部のＲＴＴおよびＰＢＳの長さを変動させ、スペーサーが３つの異なる部位（ＰＷｓｐ１０９９：ＡＣＧＴＡＣＴＧＡＴＧＴＴＡＡＣＡＧＣＴＧＡ（配列番号１４４）；ＰＷｓｐ１０９８：ＧＧＴＣＡＧＣＴＧＴＴＡＡＣＡＴＣＡＧＴＡＣ（配列番号１４５）；ＰＷｓｐ１０９４：ＴＣＣＡＧＣＣＣＧＣＴＧＧＣＣＣＴＧＴＡＡＡ）（配列番号１４６）を標的化した。
【図３０】図３０は、ＥｎＡｓＣｐｆ１（Ｈ８００Ａ）（配列番号１４９）を用いたＲＥＤＲＡＷの精密編集の割合を示している。左のパネルは、ＲＴ（５Ｍ）を用いない編集を示し、中央のパネルは、Ｃ末端に融合したＲＴ（５Ｍ）を有するＥｎＡｓＣｐｆ１（Ｈ８００Ａ）（ＥｎＡｓＣｐｆ１（Ｈ８００Ａ）－ＲＴ（５Ｍ））を用いた編集を示し、右のパネルは、Ｎ末端に融合したＲＴ（５Ｍ）を有するＥｎＡｓＣｐｆ１（Ｈ８００Ａ）（ＲＴ（５Ｍ）－ＥｎＡｓＣｐｆ１（Ｈ８００Ａ））を用いた編集を示している。この例では、ＣＣＴＣＡＣＴＣＣＴＧＣＴＣＧＧＴＧＡＡＴＴＴ（配列番号１７１）の配列を有するスペーサーで単一の部位が標的化された。
【図３１】図３１は、本発明の方法（ＲＥＤＲＡＷ）による酵母のＵＲＡ３－１標的遺伝子の編集結果を示している。上のパネルは、Ｃ末端に融合された逆転写酵素（ＲＴ）を有するＬｂＣａｓ１２ａを用いた編集結果（編集によるアデニン栄養要求性の修復に伴うコロニー形成）を示している。下のパネルは、Ｎ末端にＲＴを融合させたＬｂＣａｓ１２ａを用いた編集結果（編集によるアデニン栄養要求性の修復に伴うコロニー形成）を示している。図３１に示されている編集に使用した拡張ガイドは、シュードノットを有さないか、またはその３’末端にシュードノットを含んでいる。シュードノットは、デコイヘアピン（配列番号９５；配列番号２０３）、ｔＥｖｏＰｒｅＱ１（配列番号１５８）またはＥｖｏＰｒｅＱ１（配列番号１９１）のいずれかとして言及される。拡張ガイドは、４７、５５または６３ヌクレオチドの長さを有するＲＴＴと、４８ヌクレオチドの長さを有するＰＢＳをさらに含む。
【図３２】図３２は、本発明の方法（ＲＥＤＲＡＷ）を用いた酵母におけるＡＤＥ２標的遺伝子の編集結果を示している。上のパネルは、Ｃ末端に融合されたＲＴを有するＬｂＣ

ａｓ１２ａを用いた編集結果（編集によるウラシル栄養要求性の修復に伴うコロニー形成）を示している。下のパネルは、Ｎ末端に融合されたＲＴを有するＬｂＣａｓ１２ａを用いた編集結果（編集によるウラシル栄養要求性の修復に伴うコロニー形成）を示している。図３２に示されている編集に使用した拡張ガイドは、シュードノットを有さないか、またはその３’末端にシュードノットを含んでいる。使用されるシュードノットは、デコイヘアピン（配列番号９５、配列番号２０３）、ｔＥｖｏＰｒｅＱ１（配列番号１５８）またはＥｖｏＰｒｅＱ１（配列番号１９１）のいずれかとして言及される。拡張ガイドは、４０、５０または７２ヌクレオチドの長さを有するＲＴＴと、４８ヌクレオチドの長さを有するＰＢＳをさらに含む。一般に、拡張ガイド核酸は、５’－３’の向きにＲＴＴ、ＰＢＳ、および存在する場合には３’シュードノットを含む。デコイヘアピンの第１列目のデータでは、上および下のパネルのどちらにおいても、４０－ｂｐのＲＴＴとデコイヘアピンを有するｔａｇＲＮＡは合成できず、その条件は試験されなかった。

【図３３】図３３は、ＲＴ－ＬｂＣａｓ１２融合タンパク質（例えば、ＲＴ－ＬｂＣａｓ１２ａ）のＮ末端にそれぞれ融合されたｓｓＲＮＡ結合タンパク質、ディフェンシン（配列番号１５２）およびＯＲＦ５（配列番号１５３）を用いた場合の精密編集の割合の結果を、そのＮ末端に融合したｓｓＲＮＡ結合タンパク質を含まない同一のＲＴ－Ｃａｓ１２ａ融合タンパク質との比較で示している。

【図３４】図３４は、そのＮ末端において異なる変異を有する逆転写酵素（ＲＴ）ドメインに融合されたＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）を使用した場合の精密編集の割合の結果を示している。ＲＴは、ＲＴ（Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｗ３８８Ｒ、Ｅ６０７Ｋ）、ＲＴ（Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｗ３８８Ｒ、Ｅ６０７Ｋ）、ＲＴ（５Ｍ、Ｆ１５５Ｙ、Ｈ６３８Ｇ）、ＲＴ（５Ｍ、Ｑ２２１Ｒ、Ｖ２２３Ｍ）およびＲＴ（５Ｍ、Ｄ５２４Ｎ）を含んでいた。

【図３５】図３５は、各ｔａｇＲＮＡの３’末端に構造化ＲＮＡを含む４つの異なるｔａｇＲＮＡを用いた精密編集の割合の結果を示している。構造化ＲＮＡの核酸配列は、表１６に提供されている。

【図３６】図３６は、様々な融合の向きで本発明の構築体に融合させたクロマチン調節ペプチドを用いた精密編集の割合の結果を示している。試験したクロマチン調節ペプチドは、ＨＮ１、ＨＢ１、Ｈ１Ｇ、ＣＨＤ１を含んでいた。

【図３７】図３７は、ＭＳ２／ＭＣＰ系を用いた融合物の精密編集の割合の結果を示している。ＲＴ（５Ｍ）を有するＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９ＡをＭＣＰなしで（トランスの対照）、またはＭＣＰ－ＲＴ（５Ｍ）（融合構築体）と共に一過性に発現させた。ｔａｇＲＮＡ５とｔａｇＲＮＡ６の２つのｔａｇＲＮＡを試験した。試験した異なるｔａｇＲＮＡのバージョンは、３’末端においてＭＳ２配列で修飾したｔａｇＲＮＡを含んでいた。

【配列表フリーテキスト】

【００１４】

配列番号１～２０および１４８～１５０は、例示的なＣａｓ１２ａアミノ酸配列である。

配列番号２１および配列番号２２は、プロモーターおよびイントロンをコードする例示的な調節配列である。

配列番号２３～２５は、例示的なペプチドタグと親和性ポリペプチドを提供している。

配列番号２６～３６は、例示的なＲＮＡ動員モチーフ（RNA recruiting motif）および対応する親和性ポリペプチドを提供している。

配列番号３７～５２は、例示的な一本鎖ＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）を提供している。

配列番号５３、９７および１７２はそれぞれ、例示的な逆転写酵素ポリペプチド配列であるモロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭｕＬＶ）５（Ｍ）、ＮＬＳに隣接した５（Ｍ）、およびＭ－ＭｕＬＶを提供している。

配列番号５４～５６は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａヌクレアーゼのプロトスペーサー隣接モチーフ位置の例を提供している。

配列番号５７および配列番号５８は、例示的な本発明の構築体を提供している。
配列番号５９および配列番号６０は、例示的なＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡおよび例示的なプロトスペーサーを提供している。
配列番号６１および配列番号６２は、例示的なイントロンを提供している。
配列番号６３～８６および配列番号１５４～１５７は、例示的なＲＥＤＲＡＷエディタ構築体を提供している。
配列番号８７は、１１塩基対（ｂｐ）のプライマー結合配列および９６ｂｐの逆転写酵素鋳型を有するｔａｇＲＮＡの例を提供している。
配列番号８８～９１は、例示的なプラスミドの配列を提供している。
配列番号９２～９４は、図９～１１に示されている編集部に関連するｔａｇＲＮＡの配列をそれぞれ提供している。
配列番号９５、配列番号１５８、配列番号１９１および配列番号２０３は、例示的なシュードノット配列を提供している。
配列番号９６は、Ｈ７５９Ａの変異を有し、両側にＮＬＳが隣接している例示的なＬｂＣａｓ１２ａを提供している。
配列番号９８～１０１は、例示的な５’－３’エキソヌクレアーゼポリペプチドを提供している。
配列番号１０２および配列番号１０３は、例示的なＤＭＮＴ１標的部位および標的スペーサーを提供している。
配列番号１０４および配列番号１０５は、例示的なＦＡＮＣＦ１標的部位および標的スペーサーを提供している。
配列番号１０６および配列番号１０７は、例示的なＣａｓ９ポリペプチドを提供している。
配列番号１０８～１２２は、例示的なＣａｓ９ポリヌクレオチドを提供している。
配列番号１２３～１２８は、例示的な一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質を提供している。
配列番号１２９～１３５は、例示的な５’－３’エキソヌクレアーゼを提供している。
配列番号１３６、１３７、１４０～１４６、１５９～１６１および１７１は、例示的なスペーサーである。
配列番号１３８、１３９および１６４～１６９は、例示的な逆転写酵素鋳型を提供している。
配列番号１４０は、例示的なＧａｍタンパク質を提供している。
配列番号１５１は、例示的なＣａｓ１２ｂポリペプチドを提供している。
配列番号１５２および配列番号１５３はそれぞれ、例示的な一本鎖ＲＮＡ結合タンパク質、ディフェンシンおよびＯＲＦ５を提供している。
配列番号１６２および配列番号１６３は、例示的なプライマー結合部位（ＰＢＳ）配列を提供している。
配列番号１７０は、例示的なＬｂＣａｓ１２ａ　ｃｒＲＮＡスキャフォールドを提供している。
配列番号１７３～１８６は、例示的なｔａｇＲＮＡ（それぞれ、ｔａｇＲＮＡ１、ｔａｇＲＮＡ２、ｔａｇＲＮＡ３、ｔａｇＲＮＡ４、ｔａｇＲＮＡ５、ｔａｇＲＮＡ６、ｔａｇＲＮＡ７、ｔａｇＲＮＡ８、ｔａｇＲＮＡ９、ｔａｇＲＮＡ１０、ｔａｇＲＮＡ１１、ｔａｇＲＮＡ１２、ｔａｇＲＮＡ１３、およびｔａｇＲＮＡ１４）を提供している。
配列番号１８７および配列番号１８８は、図２７に示されている逆転写酵素鋳型である。
配列番号９５、１８９～１９８、および２０３は、例示的なＲＮＡ構造である。
配列番号１９９～２０２は、例示的なクロマチン調節ペプチドである。
配列番号２０４～２１５は、図８、図９、図１０および図１１中に見られる配列である。

【発明を実施するための形態】

【００１５】

次に本発明を、本発明の実施形態を示す添付の図面および実施例を参照して、以降で説明する。この説明は、本発明が実行され得る様々な全方法の詳細なカタログであることも、本発明に加えられ得る全ての特徴であることも意図されない。例えば、一実施形態に関して具体的に説明される特徴が、他の実施形態に組み込まれてもよく、そして特定の実施形態に関して具体的に説明される特徴が、その実施形態から消されてもよい。ゆえに、本発明は、本発明の一部の実施形態において、本明細書中で示されるあらゆる特徴または特徴の組合せを、除外することも省略することもできることを意図する。また、本明細書中で示唆される種々の実施形態に対する、本発明から逸脱しない多数の変形および追加が、本開示を考慮して、当業者にとって明らかであろう。それゆえに、以下の説明は、本発明の一部の特定の実施形態を示すことが意図されており、全ての配列、それらの組合せおよび変形を網羅的に指定することは意図されない。

【００１６】

別段定義されない限り、本明細書中で用いられる全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中で本発明の説明に用いられる専門用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のものであり、本発明の限定であることは意図されない。

【００１７】

本明細書中で引用される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参照は、参照が示されるセンテンスおよび／または段落に関連する教示について、それらの全体が、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【００１８】

文脈が別途指示しない限り、本明細書中に記載される本発明の種々の特徴を、あらゆる組合せで用いることができることが具体的に意図される。さらに、本発明はまた、本発明の一部の実施形態において、本明細書中で示されるあらゆる特徴または特徴の組合せを除外することも省略することもできることを意図する。組成物が、構成要素Ａ、Ｂ、およびＣを含むと明細書が述べているかを示すために、Ａ、Ｂ、もしくはＣのいずれか、またはそれらの組合せを単独で、またはあらゆる組合せで省略かつ放棄することができることが具体的に意図される。

【００１９】

本発明および添付の特許請求の範囲の記載に用いられている単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が別途明らかに指示しない限り、複数形を同様に含むことが意図される。

【００２０】

また、本明細書中で用いられる「および／または」は、関連する記載された項目の１つまたは複数のあらゆる全ての考えられる組合せ、および択一的に解釈される場合（「または」）の組合せの欠如を指し、かつ包含する。

【００２１】

測定可能な値、例えば量または濃度等に言及する場合に本明細書中で用いられる用語「約」は、指定された値の±１０％、±５％、±１％、±０．５％、または±０．１％の変動、ならびに指定された値を包含することを意図する。例えば、Ｘが測定可能な値である場合の「約Ｘ」は、Ｘ、ならびにＸの±１０％、±５％、±１％、±０．５％、または±０．１％の変動を含むことを意図する。計測可能な値について本明細書中で提供される範囲は、他のあらゆる範囲および／またはその中の個々の値を含み得る。

【００２２】

本明細書中で用いられる「ＸとＹとの間」および「約ＸとＹとの間」等のフレーズは、ＸおよびＹを含むと解釈されるべきである。本明細書中で用いられる「約ＸとＹとの間」等のフレーズは、「約Ｘと約Ｙとの間」を意味し、そして「約ＸからＹ」等のフレーズは、「約Ｘから約Ｙ」を意味する。

【００２３】

本明細書における値の範囲の記載は単に、本明細書に特に明記されていない限り、その

範囲内にあるそれぞれの個別の値を個別に参照する略記法として機能することを意図したものであり、各個別の値は、あたかも個別に本明細書に記載されているかのように、明細書に組み込まれる。例えば、１０から１５の範囲が開示されている場合、１１、１２、１３、および１４もまた開示されている。

【００２４】

本明細書中で用いられる用語「含む（「ｃｏｍｐｒｉｓｅ」、「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ」、および「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」）」は、明示される特徴、整数、工程、操作、要素、および／または構成要素の存在を指定するが、１つまたは複数の他の特徴、整数、工程、操作、要素、構成要素、および／またはそれらの群の存在または追加を排除しない。

【００２５】

本明細書中で用いられる移行句「から本質的になる」は、特許請求の範囲が、特許請求の範囲に列挙される指定された材料または工程、および特許請求される本発明の基本的かつ新規の特徴に物質的に影響を与えないものを包含すると解釈されるべきであることを意味する。ゆえに、本発明の特許請求の範囲で用いられる場合の用語「から本質的になる」は、「含む」に等しいと解釈されることは意図されない。

【００２６】

本明細書中で用いられる用語「増大させる（ｉｎｃｒｅａｓｅ）」、「増大させること（ｉｎｃｒｅａｓｉｎｇ）」、「増強させる（ｅｎｈａｎｃｅ）」、「増強させること（ｅｎｈａｎｃｉｎｇ）」、「改善する（ｉｍｐｒｏｖｅ）」および「改善すること（ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ）」（およびその文法上の変形）は、対照と比較して少なくとも約２５％、５０％、７５％、１００％、１５０％、２００％、３００％、４００％、５００％、またはそれを超える上昇を説明する。

【００２７】

本明細書中で用いられる用語「引き下げる」、「引き下げられた」、「引き下げること」、「引下げ」、「減少させる」、および「低下させる」（およびその文法上の変形）は、例えば、対照と比較して少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３５％、５０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、または１００％の低下を説明する。特定の実施形態において、引下げは、検出可能な活性または量をもたらし得ないか、または本質的にもたらし得ない（すなわち、有意でない量、例えば、約１０％または５％未満）。

【００２８】

「異種」または「組換え」ヌクレオチド配列は、これが導入される宿主細胞と天然に関連しないヌクレオチド配列であり、天然に存在するヌクレオチド配列の天然に存在しない複数のコピーが挙げられる。

【００２９】

「天然」または「野生型」の核酸、ヌクレオチド配列、ポリペプチド、またはアミノ酸配列は、天然に存在するか、または内因性の核酸、ヌクレオチド配列、ポリペプチド、またはアミノ酸配列を指す。したがって、例えば、「野生型ｍＲＮＡ」は、参照生物内に天然に存在する、または参照生物にとって内因性のｍＲＮＡである。「相同」核酸配列は、これが導入される宿主細胞と天然に関連するヌクレオチド配列である。

【００３０】

本明細書中で用いられる用語「核酸」、「核酸分子」、「ヌクレオチド配列」、および「ポリヌクレオチド」は、直鎖状であるか、もしくは分岐している、一本鎖もしくは二本鎖、またはそれらのハイブリッドであるＲＮＡまたはＤＮＡを指す。また、当該用語は、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドを包含する。また、ｄｓＲＮＡが合成的に生成される場合、あまり一般的でない塩基、例えばイノシン、５－メチルシトシン、６－メチルアデニン、ヒポキサンチンその他を、アンチセンス、ｄｓＲＮＡ、およびリボザイム対形成に用いることができる。例えば、ウリジンおよびシチジンのＣ－５プロピン類似体を含有するポリヌクレオチドは、高い親和性でＲＮＡに結合すること、そして遺伝子発現の強力なアンチセンスインヒビターであることが示されている。また、他の修飾、例えば、ホスホジエス

テル骨格、またはＲＮＡのリボース糖基内の２’－ヒドロキシへの修飾をすることができる。

【００３１】

本明細書中で用いられる用語「ヌクレオチド配列」は、核酸分子の５’末端から３’末端までの、ヌクレオチドのヘテロポリマーまたはヌクレオチドの配列を指し、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ断片または部分、ゲノムＤＮＡ、合成（例えば、化学的に合成された）ＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、ｍＲＮＡ、およびアンチセンスＲＮＡ（いずれも一本鎖または二本鎖であり得る）が挙げられる、ＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子が挙げられる。また、用語「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸構造体」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドのヘテロポリマーを指すのに本明細書中で互換的に用いられる。本明細書中で提供される核酸分子および／またはヌクレオチド配列が、本明細書中で左から右に５’から３’の向きに示されており、そして米国配列規則、３７ＣＦＲ§§１．８２１－１．８２５、および世界知的所有権機関（ＷＩＰＯ）基準ＳＴ．２５に示されるヌクレオチド性質を示すための標準コードを用いて表される。本明細書中で用いられる「５’領域」は、ポリヌクレオチドの５’末端に最も近いポリヌクレオチドの領域を意味し得る。ゆえに、例えば、ポリヌクレオチドの５’領域内の要素を、ポリヌクレオチドの５’末端に位置決めされた第１のヌクレオチドから、ポリヌクレオチドの途中に位置決めされたヌクレオチドまでのどこでも位置決めすることができる。本明細書中で用いられる「３’領域」は、ポリヌクレオチドの３’末端に最も近いポリヌクレオチドの領域を意味し得る。ゆえに、例えば、ポリヌクレオチドの３’領域内の要素を、ポリヌクレオチドの３’末端に位置決めされた第１のヌクレオチドから、ポリヌクレオチドの途中に位置決めされたヌクレオチドまでのどこでも位置決めすることができる。

【００３２】

本明細書中で用いられる用語「遺伝子」は、ｍＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、および抗マイクロＲＮＡアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド（ＡＭＯ）等を生成するのに用いることができる核酸分子を指す。遺伝子は、機能タンパク質または遺伝子産物を生成するのに用いることができる場合もあるし、できない場合もある。遺伝子は、コード領域および非コード領域（例えば、イントロン、調節要素、プロモーター、エンハンサー、終結配列、ならびに／または５’および３’非翻訳領域）の双方を含むことができる。遺伝子は、「単離」されていてもよく、これは、天然の状態で核酸と関連して通常見出される構成要素から実質的に、または本質的に遊離している核酸が意図される。そのような構成要素として、他の細胞物質、組換え生成物由来の培地、および／または核酸を化学的に合成するのに用いられる種々の化学物質が挙げられる。

【００３３】

用語「変異」は、点変異（例えば、ミスセンス、またはナンセンス、またはフレームシフトをもたらす単一の塩基対の挿入もしくは欠失）、挿入、欠失、および／またはトランケーションを指す。変異が、アミノ酸配列内の残基の、別の残基による置換、または配列内の１つもしくは複数の残基の欠失もしくは挿入である場合、変異は、典型的に、元の残基に続く配列内の残基の位置を同定することによって、そして新たに置換された残基を同定することによって説明される。

【００３４】

本明細書中で用いられる用語「相補的な」または「相補性」は、許容可能な塩および温度条件の下での塩基対合によるポリヌクレオチドの天然の結合を指す。例えば、配列「Ａ－Ｇ－Ｔ」（５’から３’）は、相補的な配列「Ｔ－Ｃ－Ａ」（３’から５’）に結合する。２つの一本鎖分子間の相補性は、ヌクレオチドの一部のみが結合する「部分的」であってもよいし、一本鎖分子間に総相補性が存在する場合、完全であってもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して大きな影響を有する。

【００３５】

本明細書中で用いられる「相補体」は、コンパレータヌクレオチド配列との１００％の

相補性を意味し得るし、１００％未満の相補性（例えば、約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、および９９％等の相補性）をも意味し得る。

【００３６】

本発明のヌクレオチド配列の「部分」または「断片」は、参照核酸またはヌクレオチド配列と比較して、長さが引き下げられ（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個、またはそれを超えるヌクレオチドが引き下げられ）、かつ参照核酸またはヌクレオチド配列と同一であるかまたはほぼ同一の（例えば、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一の）連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、これから本質的になる、かつ／またはこれからなるヌクレオチド配列を意味することが理解される。本発明に従うそのような核酸断片または部分は、適切な場合には、これが構成成分であるより大きなポリヌクレオチド内に含まれてもよい。一例として、本発明のガイド核酸の反復配列は、野生型Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ反復配列の一部を含み得る（例えば、野生型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ反復、例えば、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）、Ｃａｓ１２ｂ（Ｃ２ｃ１）、Ｃａｓ１２ｃ（Ｃ２ｃ３）、Ｃａｓ１２ｄ（ＣａｓＹ）、Ｃａｓ１２ｅ（ＣａｓＸ）、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、Ｃａｓ１２ｉ、Ｃ２ｃ４、Ｃ２ｃ５、Ｃ２ｃ８、Ｃ２ｃ９、Ｃ２ｃ１０、Ｃａｓ１４ａ、Ｃａｓ１４ｂ、および／またはＣａｓ１４ｃなどのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系由来の反復）。一部の実施形態において、本発明のガイド核酸の反復配列は、野生型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９反復配列の一部を含み得る。

【００３７】

相同性を有する異なる核酸またはタンパク質は、本明細書中で「相同体」と称する。用語相同体は、同じ種および他の種由来の相同配列、ならびに同じ種および他の種由来のオーソログ配列を含む。「相同性」は、位置同一性（すなわち、配列類似性または同一性）のパーセントに換算した、２つ以上の核酸および／またはアミノ酸配列間の類似性のレベルを指す。また、相同性は、異なる核酸またはタンパク質間の類似した機能特性の概念を指す。ゆえに、本発明の組成物および方法はさらに、本発明のヌクレオチド配列およびポリペプチド配列に対する相同体を含む。本明細書中で用いられる「オーソログ」は、種形成の間に共通祖先遺伝子から生じた異なる種における相同ヌクレオチド配列および／またはアミノ酸配列を指す。本発明のヌクレオチド配列の相同体は、本発明の前記ヌクレオチド配列に対して実質的な配列同一性（例えば、少なくとも約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、または１００％）を有する。

【００３８】

本明細書中で用いられる「配列同一性」は、２つの最適にアラインされたポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列が、構成要素、例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸のアラインメントのウィンドウの全体を通して不変である程度を指す。「同一性」は、Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．，ｅｄ．）Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８８）、Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｐｒｏｊｅｃｔｓ（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，ｅｄ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９３）、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ　Ｉ（Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ　Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，ｅｄｓ．）Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ（１９９４）、Ｓｅｑ

uence Analysis in Molecular Biology（von Heinje，G.，ed.）Academic Press（１９８７）、およびSequence Analysis Primer（Gribskov，M. and Devereux，J.，eds.）Stockton Press，New York（１９９１）に記載されるものが挙げられるがこれらに限定されない、知られている方法によって容易に算出することができる。

【００３９】

本明細書中で用いられる用語「配列同一性パーセント」または「同一性パーセント」は、試験（「対象」）ポリヌクレオチド分子（またはその相補鎖）と比較した、参照（「クエリ」）ポリヌクレオチド分子（またはその相補鎖）の直鎖状ポリヌクレオチド配列内の、２つの配列が最適にアラインされた場合の同一のヌクレオチドのパーセンテージを指す。一部の実施形態において、「同一性パーセント」は、参照ポリペプチドと比較したアミノ酸配列内の同一のアミノ酸のパーセンテージを指し得る。

【００４０】

本明細書中で用いられるフレーズ、２つの核酸分子、ヌクレオチド配列、またはタンパク質配列の文脈における「実質的に同一の」または「実質的同一性」は、以下の配列比較アルゴリズムの１つを用いて、または目視検査によって測定して、最大対応について比較かつアラインした場合のヌクレオチドまたはアミノ酸残基同一性が、少なくとも約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、またはそれを超える２つ以上の配列またはサブ配列を指す。本発明の一部の実施形態において、実質的同一性は、約１０ヌクレオチド～約２０ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド、約１５ヌクレオチド～約２５ヌクレオチド、約３０ヌクレオチド～約４０ヌクレオチド、約５０ヌクレオチド～約６０ヌクレオチド、約７０ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約９０ヌクレオチド～約１００ヌクレオチド、またはそれを超えるヌクレオチド長、およびそれらにおけるあらゆる範囲、最大で配列の完全長である本発明のヌクレオチド配列の連続ヌクレオチドの領域にわたって存在する。一部の実施形態において、ヌクレオチド配列は、少なくとも約２０ヌクレオチド（例えば、約２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０ヌクレオチド）にわたって、実質的に同一であり得る。一部の実施形態において、実質的に同一のヌクレオチドまたはタンパク質配列は、これが実質的に同一であるヌクレオチド（またはコードされたタンパク質配列）と実質的に同じ機能を実行する。

【００４１】

配列比較について、典型的に、一配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列がコンピュータに入力されて、必要であれば、サブ配列座標が指定されて、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。続いて、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列と比較した試験配列についての配列同一性パーセントを算出する。

【００４２】

比較ウィンドウをアラインするための配列の最適なアラインメントが、当業者に周知であり、ツール、例えばSmith and Watermanのローカル相同性アルゴリズム、Needleman and Wunschの相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipmanの類似性の検索方法によって、そして場合によってはこれらのアルゴリズムのコンピュータによる実施、例えばＧＣＧ（登録商標）Wisconsin Package（登録商標）（Accelrys Inc.，San Diego，CA）の一部として利用可能なＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＴＦＡＳＴＡによって行われてもよい。試験配列および参照配列のアラインされたセグ

メントについての「同一性分率」は、参照配列セグメント内の構成要素の総数、例えば、参照配列全体、または参照配列の定義した、より小さな部分で割った、２つのアラインされた配列によって共有される同一の構成要素の数である。配列同一性パーセントは、１００を乗算した同一性分率として表される。１つまたは複数のポリヌクレオチド配列の比較は、全長ポリヌクレオチド配列もしくはその一部、またはより長いポリヌクレオチド配列に対してであってもよい。また、本発明の目的上、「同一性パーセント」は、翻訳されたヌクレオチド配列についてＢＬＡＳＴＸバージョン２．０、そしてポリヌクレオチド配列についてＢＬＡＳＴＮバージョン２．０を用いて求められてもよい。

【００４３】

また、２つのヌクレオチド配列は、２つの配列がストリンジェント条件の下で互いにハイブリダイズする場合、実質的に相補的であると考えてもよい。代表的な一部の実施形態において、実質的に相補的であると考えられる２つのヌクレオチド配列は、高度にストリンジェントな条件の下で、互いにハイブリダイズする。

【００４４】

サザンハイブリダイゼーションおよびノーザンハイブリダイゼーション等の核酸ハイブリダイゼーション実験の文脈における「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」および「ストリンジェントハイブリダイゼーション洗浄条件」は、配列依存的であり、様々な環境パラメータの下で異なる。核酸のハイブリダイゼーションの広範囲にわたるガイドが、Ｔｉｊｓｓｅｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ－Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｏｂｅｓ ｐａｒｔ Ｉ ｃｈａｐｔｅｒ２“Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｏｆ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｐｒｏｂｅ ａｓｓａｙｓ”Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）において見出される。通常、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、定義したイオン強度およびｐＨでの特定の配列についての熱融点（T_m）よりも約５℃低くなるように選択される。

【００４５】

T_mは、標的配列の５０％が、完全にマッチするプローブにハイブリダイズする（定義したイオン強度およびｐＨ下での）温度である。特定のプローブについてのT_mと等しくなるように、非常にストリンジェントな条件が選択される。サザンブロットまたはノーザンブロットにおいてフィルター上に１００を超える相補的な残基を有する相補的なヌクレオチド配列のハイブリダイゼーション用のストリンジェントハイブリダイゼーション条件の例として、ハイブリダイゼーションが一晩実行される、４２℃での１ｍｇヘパリン入り５０％ホルムアミドがある。高度にストリンジェントな洗浄条件の例として、７２℃にて約１５分間の０．１　５Ｍ　ＮａＣｌがある。ストリンジェント洗浄条件の例として、６５℃にて１５分間の０．２×ＳＳＣ洗浄がある（ＳＳＣバッファの解説について、以下のＳａｍｂｒｏｏｋ参照）。多くの場合、高ストリンジェンシー洗浄が、バックグラウンドプローブシグナルを取り除くために、低ストリンジェンシー洗浄の後にある。例えば１００を超えるヌクレオチドの二重鎖についての中程度のストリンジェンシー洗浄の例として、４５℃にて１５分間の１×ＳＳＣがある。例えば１００を超えるヌクレオチドの二重鎖についての低ストリンジェンシー洗浄の例として、４０℃にて１５分間の４～６×ＳＳＣがある。短いプローブ（例えば約１０～５０ヌクレオチド）について、ストリンジェント条件は、典型的に、約１．０Ｍ　Ｎａイオン未満の塩濃度、典型的にはｐＨ７．０～８．３にて約０．０１～１．０Ｍ　Ｎａイオン濃度（または他の塩）を包含し、温度は、典型的に、少なくとも約３０℃である。また、ストリンジェント条件は、ホルムアミド等の不安定化剤を添加することで達成することができる。一般に、特定のハイブリダイゼーションアッセイにおいて無関係なプローブについて観察されるよりも２×（またはより高い）の信号雑音比が、特異的ハイブリダイゼーションの検出を示す。ストリンジェント条件下で互いにハイブリダイズしないヌクレオチド配列は、コードするタンパク質が実質的に同

ーであるならば、やはり実質的に同一である。これは、例えば、ヌクレオチド配列のコピーが、遺伝コードによって容認される最大コドン縮重を用いて生じる場合に、起こり得る。

【００４６】

本発明のポリヌクレオチドおよび／または組換え核酸構造体は、発現のためにコドン最適化されていてもよい。一部の実施形態において、（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質）、逆転写酵素、フラップエンドヌクレアーゼ、５’－３’エキソヌクレアーゼなどを含む／コードする）本発明のポリヌクレオチド、核酸構造体、発現カセット、および／またはベクターは、生物（例えば、特定の種）、場合によっては動物、植物、菌類、古細菌、または細菌における発現のためにコドン最適化されている。一部の実施形態において、コドン最適化された本発明の核酸構造体、ポリヌクレオチド、発現カセットおよび／もしくはベクターは、コドン最適化されていない核酸構造体、ポリヌクレオチド、発現カセットおよび／もしくはベクターに対して約７０％から約９９．９％、またはそれを超える（例えば、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、または９９．９％）同一性を有する。

【００４７】

本明細書中に記載される実施形態のいずれにおいても、本発明のポリヌクレオチドまたは核酸構造体は、植物および／または植物の細胞内での発現用の種々のプロモーターおよび／または他の調節要素と作動可能に関連し得る。ゆえに、一部の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドまたは核酸構造体はさらに、１つまたは複数のヌクレオチド配列に作動可能に連結した１つまたは複数のプロモーター、イントロン、エンハンサー、および／またはターミネーターを含んでいてもよい。一部の実施形態において、プロモーターはイントロンと作動可能に結合していてもよい（例えば、Ｕｂｉ１プロモーターとイントロン）。一部の実施形態において、イントロンに結合したプロモーターは、「プロモーター領域」として言及され得る（例えば、Ｕｂｉ１プロモーターとイントロン）。

【００４８】

ポリヌクレオチドに関して本明細書中で用いられる「作動可能に連結された」または「作動可能に結合された」とは、指し示された要素が、互いに機能的に関連しており、一般に物理的にも関連していることを意味する。ゆえに、本明細書中で用いられる用語「作動可能に連結した」または「作動可能に関連した」は、機能的に関連する単一の核酸分子上のヌクレオチド配列を指す。ゆえに、第２のヌクレオチド配列に作動可能に連結した第１のヌクレオチド配列は、第１のヌクレオチド配列が第２のヌクレオチド配列と機能的に関係して配置されている状況を意味する。例えば、プロモーターは、プロモーターが前記ヌクレオチド配列の転写または発現をもたらすならば、ヌクレオチド配列と作動可能に関連している。当業者であれば、制御配列（例えばプロモーター）がその発現を導くように機能する限り、制御配列が、作動可能に関連するヌクレオチド配列と連続している必要がないことを理解するであろう。ゆえに、例えば、転写はされるが翻訳されない介在核酸配列が、プロモーターとヌクレオチド配列との間に存在し得、そしてプロモーターは依然として、ヌクレオチド配列に「作動可能に連結している」と考えることができる。

【００４９】

本明細書中で用いられる用語、ポリペプチドに関して「連結した」は、一方のポリペプチドの、もう一方への付着を指す。ポリペプチドは、別のポリペプチドに（Ｎ末端またはＣ末端にて）直接（例えば、ペプチド結合を介して）連結されても、リンカーを介して連結されてもよい。

【００５０】

用語「リンカー」は、当該技術において認識されており、２つの分子または部分、例えば、融合タンパク質の２つのドメイン、例えば、ＤＮＡ結合ポリペプチドもしくはドメイ

ンとペプチドタグ、および／または逆転写酵素とペプチドタグに結合する親和性ポリペプチド；または、ＤＮＡエンドヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメインとペプチドタグ、および／または逆転写酵素とペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドなどを連結する化学基または分子を指す。リンカーは、単一の連結分子で構成されてもよいし、複数の連結分子を含んでもよい。一部の実施形態において、リンカーは、有機分子、基、ポリマー、または二価の有機部分などの化学部分であり得る。一部の実施形態において、リンカーは、アミノ酸であってもよく、またはペプチドであってもよい。一部の実施形態において、リンカーは、ペプチドである。

【００５１】

一部の実施形態において、本発明で有用なペプチドリンカーは、長さが約２から約１００以上のアミノ酸、例えば、長さが約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上のアミノ酸（例えば、約２から約４０、約２から約５０、約２から約６０、約４から約４０、約４から約５０、約４から約６０、約５から約４０、約５から約５０、約５から約６０、約９から約４０、約９から約５０、約９から約６０、約１０から約４０、約１０から約５０、約１０から約６０、または長さが約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５から約２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上のアミノ酸（例えば、長さが約１０５、１１０、１１５、１２０、１３０、１４０、１５０以上のアミノ酸）であり得る。一部の実施形態において、ペプチドリンカーは、ＧＳリンカーであってもよい。

【００５２】

本明細書中で用いられる、ポリヌクレオチドに関する「連結された」または「融合された」という用語は、あるポリヌクレオチドの別のポリヌクレオチドへの付着を指す。一部の実施形態において、２つ以上のポリヌクレオチド分子は、有機分子、基、ポリマー、または二価の有機部分などの化学部分であり得るリンカーによって連結されていてもよい。ポリヌクレオチドは、共有結合もしくは非共有結合または例えば、ワトソンクリック塩基対合を含む結合を介して、または１つまたは複数の連結ヌクレオチドを通して、別のポリヌクレオチド（５’末端または３’末端で）に連結または融合されていてもよい。一部の実施形態において、特定の構造のポリヌクレオチドモチーフは、別のポリヌクレオチド配列内に挿入されていてもよい（例えば、ガイドＲＮＡ中のヘアピン構造の伸長）。一部の実施形態において、連結ヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチドであり得る。一部の実施形態において、連結ヌクレオチドは、天然に存在しないヌクレオチドであってもよい。

【００５３】

「プロモーター」は、プロモーターと作動可能に関連するヌクレオチド配列（例えばコード配列）の転写を制御または調節するヌクレオチド配列である。プロモーターによって制御または調節されるコード配列は、ポリペプチドおよび／または機能ＲＮＡをコードし得る。典型的には、「プロモーター」は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩの結合部位を含有し、かつ転写の開始を指示するヌクレオチド配列を指す。一般に、プロモーターは、対応する

コード配列のコード領域の開始点に対して、５’側、または上流側に見出される。プロモーターは、遺伝子発現の調節因子の働きをする他の要素、例えば、プロモーター領域を含んでもよい。これは、ＴＡＴＡボックスコンセンサス配列および多くの場合ＣＡＡＴボックスコンセンサス配列を含む（Ｂｒｅａｔｈｎａｃｈ ａｎｄ Ｃｈａｍｂｏｎ，（１９８１）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５０：３４９）。植物では、ＣＡＡＴボックスは、ＡＧＧＡボックスによって置換されている場合がある（Ｍｅｓｓｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，（１９８３）ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ Ｐｌａｎｔｓ，Ｔ．Ｋｏｓｕｇｅ，Ｃ．Ｍｅｒｅｄｉｔｈ ａｎｄ Ａ．Ｈｏｌｌａｅｎｄｅｒ（ｅｄｓ．），Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ．２１１－２２７）。一部の実施形態において、プロモーター領域は、少なくとも１つのイントロンを含み得る（例えば、配列番号２１、配列番号２２参照）。

【００５４】

本発明で有用なプロモーターは、例えば、組換え核酸分子、例えば「合成核酸構造体」または「タンパク質－ＲＮＡ複合体」の調製に使用するための、構成的、誘導性、時間的に調節される、発生的に調節される、化学的に調節される、組織優先的および／または組織特異的なプロモーターを含み得る。これらの種々のタイプのプロモーターが、当該技術において知られている。

【００５５】

プロモーターの選択は、発現の時間的かつ空間的必要条件に応じて変わってもよいし、形質転換されることとなる宿主細胞に基づいて変わってもよい。様々な多くの生物用のプロモーターが、当該技術において周知である。当該技術において存在する広範囲にわたる知識に基づいて、注目する特定の宿主生物に適したプロモーターを選択することができる。ゆえに、例えば、モデル生物において高度に構成的に発現される遺伝子の上流側のプロモーターについてかなり知られており、そのような知識は、必要に応じて、他の系において容易にアクセスすることができ、かつ実行することができる。

【００５６】

一部の実施形態では、植物内で機能的なプロモーターが、本発明の構築体と共に使用され得る。植物における発現を駆動するのに有用なプロモーターの非限定的な例は、ＲｕｂｉｓＣｏ小サブユニット遺伝子１（ＰｒｂｃＳ１）のプロモーター、アクチン遺伝子（Ｐａｃｔｉｎ）のプロモーター、硝酸還元酵素遺伝子（Ｐｎｒ）のプロモーター、重複炭酸脱水酵素遺伝子１（Ｐｄｃａ１）のプロモーターを含む（Ｗａｌｋｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ．２３：７２７－７３５（２００５）；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ ４０３：１３２－１４２（２００７）；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐ．３７：１１４３－１１５４（２０１０）を参照）。ＰｒｂｃＳ１およびＰａｃｔｉｎは、構成的プロモーターであり、ＰｎｒおよびＰｄｃａ１は、誘導性プロモーターである。Ｐｎｒは硝酸塩によって誘導され、アンモニウムによって抑制され（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ ４０３：１３２－１４２（２００７））、Ｐｄｃａ１は塩によって誘導される（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐ．３７：１１４３－１１５４（２０１０））。一部の実施形態において、本発明で有用なプロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（Ｐｏｌ ＩＩ）プロモーターである。一部の実施形態において、トウモロコシ（Ｚｅａ ｍａｙｓ）由来のＵ６プロモーターまたは７ＳＬプロモーターは、本発明の構築体に有用であり得る。一部の実施形態において、トウモロコシ由来のＵ６ｃプロモーターおよび／または７ＳＬプロモーターは、ガイド核酸の発現を駆動するのに役立ち得る。一部の実施形態において、ダイズ（Ｇｌｙｃｉｎｅ ｍａｘ）由来のＵ６ｃプロモーター、Ｕ６ｉプロモーターおよび／または７ＳＬプロモーターは、本発明の構築体に有用であり得る。一部の実施形態において、ダイズ由来のＵ６ｃプロモーター、Ｕ６ｉプロモーターおよび／または７ＳＬプロモーターは、ガイド核酸の発現を駆動するのに役立ち得る。

【００５７】

植物に有用な構成的プロモーターの例は、ケストルム属ウイルス（ｃｅｓｔｒｕｍ ｖｉｒｕｓ）プロモーター（ｃｍｐ）（米国特許第７，１６６，７７０号）、イネアクチン

１プロモーター（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１２：３３９９－３４０６；および米国特許第５，６４１，８７６号）、ＣａＭＶ　３５Ｓプロモーター（Ｏｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ　３１３：８１０－８１２）、ＣａＭＶ　１９Ｓプロモーター（Ｌａｗｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．９：３１５－３２４）、ｎｏｓプロモーター（Ｅｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ　８４：５７４５－５７４９）、Ａｄｈプロモーター（Ｗａｌｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：６６２４－６６２９）、スクロース合成酵素プロモーター（Ｙａｎｇ　＆　Ｒｕｓｓｅｌｌ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：４１４４－４１４８）、およびユビキチンプロモーターを含むが、これらに限定されない。ユビキチンに由来する構成的プロモーターは、多くの細胞型において蓄積する。ユビキチンプロモーターは、トランスジェニック植物、例えば、ヒマワリ（Ｂｉｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１．Ｐｌａｎｔ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　７９：８７－９４）、トウモロコシ（Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９．Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．１２：６１９－６３２）およびシロイヌナズナ（ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）（Ｎｏｒｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３．Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２１：８９５－９０６）で使用するために、いくつかの植物種からクローニングされている。トウモロコシのユビキチンプロモーター（ＵｂｉＰ）は、トランスジェニック単子葉植物系において開発されており、単子葉植物形質転換のために構築されたその配列およびベクターは、特許公報第ＥＰ０３４２９２６号に開示されている。ユビキチンプロモーターは、トランスジェニック植物、特に単子葉植物における本発明のヌクレオチド配列の発現に適している。さらに、ＭｃＥｌｒｏｙ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２３１：１５０－１６０（１９９１））によって記載されたプロモーター発現カセットは、本発明のヌクレオチド配列の発現のために容易に修飾することができ、単子葉植物宿主での使用に特に適している。

【００５８】

一部の実施形態において、組織特異的／組織優先的プロモーターを、植物細胞における異種ポリヌクレオチドの発現に使用することができる。組織特異的もしくは優先的な発現パターンは、葉組織特異的もしくは優先的、根特異的もしくは優先的、茎特異的もしくは優先的、花特異的もしくは優先的、または花粉特異的もしくは優先的を含むが、これらに限定はされない。葉組織における発現に適したプロモーターは、光合成に関与する遺伝子を制御するものを多く含んでおり、これらの多くは、単子葉植物と双子葉植物の両方でクローニングされている。一実施形態において、本発明で有用なプロモーターは、ホスホエノールカルボキシラーゼ遺伝子由来のトウモロコシＰＥＰＣプロモーター（Ｈｕｄｓｐｅｔｈ　＆　Ｇｒｕｌａ，Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．１２：５７９－５８９（１９８９））である。組織特異的プロモーターの非限定的な例は、種子貯蔵タンパク質（β－コングリシニン、クルシフェリン、ナピンおよびファセオリンなど）、ゼインまたは油体タンパク質（オレオシンなど）、または脂肪酸生合成に関与するタンパク質（アシルキャリアタンパク質、ステアロイル－ＡＣＰデサチュラーゼおよび脂肪酸デサチュラーゼ（ｆａｄ　２－１）を含む）をコードする遺伝子、ならびに胚発生中に発現される他の核酸（Ｂｃｅ４など、例えばＫｒｉｄｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｓｅｅｄ　Ｓｃｉ．Ｒｅｓ．１：２０９－２１９ならびに欧州特許第２５５３７８号を参照）に関連するものを含む。植物、特にトウモロコシにおける本発明のヌクレオチド配列の発現に有用な組織特異的または組織選択的プロモーターは、根、髄、葉または花粉における発現を指示するものを含むが、これらに限定はされない。そのようなプロモーターは、例えば、その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとするＷＯ９３／０７２７８に開示されている。本発明に有用な組織特異的プロモーターまたは組織優先的プロモーターの他の非限定的な例は、米国特許第６，０４０，５０４号に開示されているワタｒｕｂｉｓｃｏプロモーター；米国特許第５，６０４，１２１号に開示されているイネスクロース合成酵素プロモーター；ｄｅ　Ｆｒａｍｏｎｄによって記載された根特異的プロモーター（ＦＥＢＳ

２９０：１０３－１０６（１９９１）；Ｃｉｂａ－ＧｅｉｇｙのＥＰ０４５２２６９）；米国特許第５，６２５，１３６号（Ｃｉｂａ－Ｇｅｉｇｙ）に記載されており、トウモロコシｔｒｐＡ遺伝子の発現を駆動する茎特異的プロモーター；ＷＯ０１／７３０８７に開示されているケストルム属黄色縮葉ウイルスプロモーターを含む；そして、花粉特異的または優先的プロモーターは、イネ由来のＰｒｏＯｓＬＰＳ１０およびＰｒｏＯｓＬＰＳ１１（Ｎｇｕｙｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｒｅｐｏｒｔｓ ９（５）：２９７－３０６（２０１５））、トウモロコシ由来のＺｍＳＴＫ２＿ＵＳＰ（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ ６０（６）：４８５－４９５（２０１７））、トマト由来のＬＡＴ５２およびＬＡＴ５９（Ｔｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １０９（３）：７０５－７１３（１９９０））、Ｚｍ１３（米国特許第１０，４２１，９７２号）、シロイヌナズナ由来のＰＬＡ$_2$－δプロモーター（米国特許第７，１４１，４２４号）、および／またはトウモロコシ由来のＺｍＣ５プロモーター（国際ＰＣＴ公開番号ＷＯ１９９９／０４２５８７）を含むが、これらに限定はされない。

【００５９】

植物組織特異的／組織優先的プロモーターの追加の例は、根毛特異的シスエレメント（ＲＨＥ）（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １８：２９５８－２９７０（２００６））、根特異的プロモーターＲＣｃ３（Ｊｅｏｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１５３：１８５－１９７（２０１０））およびＲＢ７（米国特許第５４５９２５２号）、レクチンプロモーター（Ｌｉｎｄｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｄｅｒ．Ｇｅｎｅｔ．１１：１６０－１６７；およびＶｏｄｋｉｎ（１９８３）Ｐｒｏｇ．Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｓ．１３８：８７－９８）、トウモロコシアルコールデヒドロゲナーゼ１プロモーター（Ｄｅｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１２：３９８３－４０００）、Ｓ－アデノシル－Ｌ－メチオニンシンテターゼ（ＳＡＭＳ）（Ｖａｎｄｅｒ Ｍｉｊｎｓｂｒｕｇｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｌａｎｔ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ、３７（８）：１１０８－１１１５）、トウモロコシ光収穫複合体プロモーター（Ｂａｎｓａｌ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：３６５４－３６５８）、トウモロコシ熱ショックタンパク質プロモーター（Ｏ’Ｄｅｌｌ ｅｔ ａｌ．（１９８５）ＥＭＢＯ Ｊ．５：４５１－４５８；およびＲｏｃｈｅｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８６）ＥＭＢＯ Ｊ．５：４５１－４５８）、エンドウマメ小サブユニットＲｕＢＰカルボキシラーゼプロモーター（Ｃａｓｈｍｏｒｅ，“Ｎｕｃｌｅａｒ ｇｅｎｅｓ ｅｎｃｏｄｉｎｇ ｔｈｅ ｓｍａｌｌ ｓｕｂｕｎｉｔ ｏｆ ｒｉｂｕｌｏｓｅ－１，５－ｂｉｓｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｃａｒｂｏｘｙｌａｓｅ”ｐｐ．２９－３９ Ｉｎ：Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ Ｐｌａｎｔｓ（Ｈｏｌｌａｅｎｄｅｒ ｅｄ．，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ １９８３；およびＰｏｕｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２０５：１９３－２００）、Ｔｉプラスミドマンノピン合成酵素プロモーター（Ｌａｎｇｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：３２１９－３２２３）、Ｔｉプラスミドノパリン合成酵素プロモーター（Ｌａｎｇｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９８９）、前出）、ペチュニアカルコンイソメラーゼプロモーター（ｖａｎ Ｔｕｎｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）ＥＭＢＯ Ｊ．７：１２５７－１２６３）、マメグリシンリッチタンパク質１プロモーター（Ｋｅｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：１６３９－１６４６）、切断型ＣａＭＶ ３５Ｓプロモーター（Ｏ’Ｄｅｌｌ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１３：８１０－８１２）、ジャガイモパタチンプロモーター（Ｗｅｎｚｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１３：３４７－３５４）、根細胞プロモーター（Ｙａｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：７４４９）、トウモロコシゼインプロモーター（Ｋｒｉｚ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２０７：９０－９８；Ｌａｎｇｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｃｅｌｌ ３４：１０１５－１０２２；Ｒｅｉｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉ

ｄｓ Ｒｅｓ．１８：６４２５；Ｒｅｉｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：７４４９；およびＷａｎｄｅｌｔ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：２３５４）、グロブリン－１プロモーター（Ｂｅｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １２９：８６３－８７２）、α－チューブリンｃａｂプロモーター（Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２１５：４３１－４４０）、ＰＥＰＣａｓｅプロモーター（Ｈｕｄｓｐｅｔｈ ＆ Ｇｒｕｌａ（１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１２：５７９－５８９）、Ｒ遺伝子複合体関連プロモーター（Ｃｈａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １：１１７５－１１８３）、およびカルコン合成酵素プロモーター（Ｆｒａｎｋｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）ＥＭＢＯ Ｊ．１０：２６０５－２６１２）を含むが、これらに限定はされない。

【００６０】

種子特異的な発現に有用なものは、エンドウマメのビシリンプロモーター（Ｃｚａｋｏ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２３５：３３－４０；および米国特許第５，６２５，１３６号に開示されている種子特異的プロモーターである。成熟した葉における発現に有用なプロモーターは、シロイヌナズナ由来のＳＡＧプロモーターなどといった老化の開始時に切り替わるプロモーターである（Ｇａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：１９８６－１９８８）。

【００６１】

さらに、葉緑体で機能するプロモーターを使用することができる。そのようなプロモーターの非限定的な例は、バクテリオファージＴ３遺伝子９の５’ＵＴＲおよび米国特許第７，５７９，５１６号に開示されている他のプロモーターを含む。本発明で有用な他のプロモーターは、Ｓ－Ｅ９小サブユニットＲｕＢＰカルボキシラーゼプロモーターおよびクニッツトリプシンインヒビター遺伝子プロモーター（Ｋｔｉ３）を含むが、これらに限定はされない。

【００６２】

本発明で有用な追加の調節要素は、イントロン、エンハンサー、終止配列、ならびに／または５’および３’非翻訳領域を含むが、これらに限定はされない。

【００６３】

本発明で有用なイントロンは、植物内で同定され、植物から単離され、次いで植物の形質転換に使用される発現カセットに挿入されるイントロンであり得る。当業者には理解されるように、イントロンは、自己切除に必要な配列を含むことができ、インフレームで核酸構造体／発現カセットに組み込まれる。イントロンは、１つの核酸構造体内の複数のタンパク質コード配列を分離するスペーサーとして使用することも、１つのタンパク質コード配列内で、例えば、ｍＲＮＡを安定化するために使用することもできる。それらがタンパク質コード配列内で使用される場合、それらは切除部位を含めて「インフレーム」で挿入される。イントロンは、発現を改善または修飾するためにプロモーターと結合されていてもよい。一例として、本発明で有用なプロモーター／イントロンの組合せは、トウモロコシＵｂｉ１プロモーターとイントロンの組合せを含むが、これに限定はされない。

【００６４】

本発明で有用なイントロンの非限定的な例は、ＡＤＨＩ遺伝子由来のイントロン（例えば、Ａｄｈ１－Ｓイントロン１、２、６）、ユビキチン遺伝子（Ｕｂｉ１）、ＲｕＢｉｓＣＯ小サブユニット（ｒｂｃＳ）遺伝子、ＲｕＢｉｓＣＯ大サブユニット（ｒｂｃＬ）遺伝子、アクチン遺伝子（例えば、アクチン－１イントロン）、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ遺伝子（ｐｄｋ）、硝酸還元酵素遺伝子（ｎｒ）、重複炭酸脱水酵素遺伝子１（Ｔｄｃａ１）、ｐｓｂＡ遺伝子、ａｔｐＡ遺伝子、またはそれらの任意の組合せを含む。イントロン配列の例は、配列番号６１および配列番号６２を含み得るが、これらに限定はされない。

【００６５】

一部の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドおよび／または核酸構造体は、「

発現カセット」であってもよいし、または発現カセット内に含まれていてもよい。本明細書中で用いられる、「発現カセット」とは、例えば、本発明の核酸構造体（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、逆転写酵素ポリペプチドもしくはドメイン、フラップエンドヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメイン（例えば、ＦＥＮ））、および／または５’－３’エキソヌクレアーゼ）を含む組換え核酸分子を意味し、ここで、核酸構造体は１つまたは複数の制御配列（例えば、プロモーター、ターミネーターなど）と作動可能に結合されている。したがって、本発明の一部の実施形態は、例えば、本発明の核酸構造体（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質もしくはドメイン、逆転写酵素ポリペプチドもしくはドメイン、フラップエンドヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメイン、および／または５’－３’エキソヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメインをコードする本発明の核酸構造体）を発現するように設計された発現カセットを提供する。本発明の発現カセットが２つ以上のポリヌクレオチドを含む場合、ポリヌクレオチドは、全てのポリヌクレオチドの発現を駆動する単一のプロモーターに作動可能に連結されていてもよく、またはポリヌクレオチドは、１つまたは複数の別個のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい（例えば、３つのポリヌクレオチドが、任意の組合せで１つ、２つまたは３つのプロモーターによって駆動されてもよい）。２つ以上の別個のプロモーターが使用される場合、プロモーターは同一のプロモーターであってもよいし、それらは異なるプロモーターであってもよい。したがって、発現カセット中に含まれるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質もしくはドメインをコードするポリヌクレオチド、逆転写酵素ポリペプチドもしくはドメインをコードするポリヌクレオチド、フラップエンドヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメインをコードするポリヌクレオチド、および／または５’－３’エキソヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメインをコードするポリヌクレオチドはそれぞれ、別個のプロモーターに作動可能に連結されていてもよく、またはそれらは任意の組合せで２つ以上のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。

【００６６】

本発明の核酸構造体を含む発現カセットは、キメラであってもよく、これは、その構成要素の少なくとも１つが、その他の構成要素の少なくとも１つに関して、異種であることを意味する（例えば、宿主生物において発現されることとなる、注目するポリヌクレオチドと作動可能に連結した、宿主生物由来のプロモーター、ここで、注目するポリヌクレオチドは、宿主とは異なる生物由来であるか、または当該プロモーターと関連して通常は見出されない）。また、発現カセットは、天然に存在するが、異種発現に有用な組換え形態で得られたものであってもよい。

【００６７】

発現カセットは、場合によっては、選択された宿主細胞内で機能的である転写および／または翻訳終止領域（すなわち、終止領域）および／またはエンハンサー領域を含んでもよい。様々な転写ターミネーターおよびエンハンサーが、当技術分野で知られており、発現カセットでの使用に利用可能である。転写ターミネーターは、転写の終止と正確なｍＲＮＡポリアデニル化を担っている。終止領域および／またはエンハンサー領域は、転写開始領域にとって固有のものであってもよく、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードする遺伝子、逆転写酵素をコードする遺伝子、フラップエンドヌクレアーゼをコードする遺伝子にとって固有のものであってもよく、ならびに／または５’－３’エキソヌクレアーゼをコードする遺伝子は、宿主細胞にとって固有のものであっても、別の供給源に固有（例えば、プロモーターに対して、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードする遺伝子、逆転写酵素をコードする遺伝子、フラップエンドヌクレアーゼをコードする遺伝子、および／または５’－３’エキソヌクレアーゼをコードする遺伝子に対して、宿主細胞に対して、またはそれらの任意の組合せに対して外来性または異種）のものであってもよい。

【００６８】

また、本発明の発現カセットは、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを含むことができ、これは、形質転換された宿主細胞を選択するのに用いることができる。本明細

書中で用いられる「選択マーカー」は、発現された場合に、マーカーを発現する宿主細胞に目立った表現型を与えるので、そのような形質転換された細胞を、マーカーを有していない細胞から区別することができるポリヌクレオチド配列を意味する。そのようなポリヌクレオチド配列は、マーカーが、化学手段によって、例えば選択剤（例えば抗生物質等）を用いることによって選択され得る形質を付与するかどうかに応じて、またはマーカーが単純に、観察もしくは試験を通して、例えばスクリーニング（例えば蛍光）によって識別することができる形質であるかに応じて、選択マーカーまたはスクリーニングマーカーをコードし得る。適した選択マーカーの多くの例が、当該技術において知られており、本明細書中に記載される発現カセットに用いることができる。

【００６９】

発現カセットに加えて、本明細書中に記載される核酸分子／構築体およびポリヌクレオチド配列は、ベクターと関連させて用いることができる。用語「ベクター」は、細胞中に核酸（複数可）を伝達するか、送達するか、または導入するための組成物を指す。ベクターは、伝達されるか、送達されるか、導入されるヌクレオチド配列を含む核酸構造体を含む。宿主生物の形質転換に用いられるベクターは、当該技術において周知である。ベクターの一般的なクラスの非限定的な例は、自己伝染性であっても可動性であってもよいしそうでなくてもよい二本鎖または一本鎖の直鎖状または環状の形態の、ウイルスベクター、プラスミドベクター、ファージベクター、ファージミドベクター、コスミドベクター、フォスミドベクター、バクテリオファージ、人工染色体、ミニサークル、またはアグロバクテリウム属（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）バイナリーベクターを含む。一部の実施形態において、ウイルスベクターとして、以下に限定されないが、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、または単純ヘルペスウイルスのベクターが挙げられ得る。本明細書中で定義されるベクターは、細胞ゲノム中への組込み、または染色体外の存在（例えば、複製起点を有する自律複製プラスミド）のいずれかによって、原核生物宿主または真核生物宿主を形質転換することができる。加えて、含まれるのは、２つの異なる宿主生物内での複製が天然で、または設計によって可能なＤＮＡビヒクルを意味するシャトルベクターであり、これは、アクチノミセスおよび関連する種、細菌、および真核生物（例えば、より高次の植物、哺乳動物、酵母、または真菌の細胞）から選択され得る。一部の実施形態において、ベクター内の核酸は、宿主細胞内での転写に適したプロモーターまたは他の調節要素の制御下にあり、かつこれと作動可能に連結されている。ベクターは、複数の宿主において機能する二元機能性発現ベクターであってもよい。ゲノムＤＮＡの場合には、これは、それ自体のプロモーターおよび／または他の調節要素を含有してもよく、そしてｃＤＮＡの場合には、これは、宿主細胞内での発現に適したプロモーターおよび／または他の調節要素の制御下にあってもよい。したがって、本発明の核酸構造体またはポリヌクレオチドおよび／またはそれを含む発現カセットが、本明細書中に記載されるベクター、および当該技術において知られているベクター内に含まれていてもよい。

【００７０】

本明細書中で用いられる「接触させる」、「接触させている」、「接触した」、およびその文法上の変形は、所望される反応（例えば、形質転換、転写制御、ゲノム編集、ニッキング、および／または切断）の構成要素を、所望される反応を実行するのに適した条件下に一緒に置くことを指す。一例として、標的核酸は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質と逆転写酵素が発現され、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が標的核酸に結合し、逆転写酵素がＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されているか、（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されたペプチドタグと逆転写酵素に融合された親和性タグを介して）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に動員され、よって、逆転写酵素が標的核酸の近くに配置される条件下で、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、および逆転写酵素またはそれをコードする核酸構造体と接触させられ、それによって標的核酸が修飾されてもよい。他のタンパク質－タンパク質相互作用、また、ＲＮＡ－タンパク質相互作用および

化学的相互作用を利用する他の方法が、逆転写酵素を動員するために使用されてもよい。
【００７１】
本明細書中で用いられる、標的核酸に関する「修飾すること」または「修飾」は、編集（例えば変異）、共有結合修飾、核酸／ヌクレオチド塩基の交換／置換、欠失、切断、ニッキング、および／または標的核酸の転写制御を含む。一部の実施形態において、修飾は、任意のサイズのインデルおよび／または任意の型の単一塩基変化（ＳＮＰ）を含み得る。
【００７２】
注目するポリヌクレオチドの文脈における「導入すること」、「導入する」、「導入された」（およびその文法上の変形）は、注目するヌクレオチド配列（例えば、ポリヌクレオチド、核酸構造体、および／またはガイド核酸）を、宿主生物または前記生物の細胞（例えば、宿主細胞、例えば、植物細胞）に、ヌクレオチド配列が細胞の内部へのアクセスを獲得するように提示することを意味する。
【００７３】
用語「形質転換」または「トランスフェクション」は、交換可能に使用することができ、本明細書中で用いられる場合、細胞中への異種核酸の導入を指す。細胞の形質転換は、安定していてもよいし、一過性であってもよい。ゆえに、一部の実施形態において、宿主細胞または宿主生物は、本発明のポリヌクレオチド／核酸分子で安定して形質転換されてもよい。一部の実施形態において、宿主細胞または宿主生物は、本発明の核酸構造体で一時的に形質転換されてもよい。
【００７４】
ポリヌクレオチドの文脈における「一過性の形質転換」は、ポリヌクレオチドが細胞中に導入されて、細胞のゲノム中に組み込まれないことを意味する。
【００７５】
細胞中に導入されるポリヌクレオチドの文脈における、「安定して導入すること」または「安定して導入される」によって意図されるのは、導入されたポリヌクレオチドが、細胞のゲノム中に安定して組み込まれていることで、細胞は、ポリヌクレオチドで安定して形質転換されていることである。
【００７６】
本明細書中で用いられる「安定した形質転換」または「安定して形質転換された」は、核酸分子が細胞中に導入されて、細胞のゲノム中に組み込まれることを意味する。したがって、組み込まれた核酸分子は、その後代によって、より詳細には複数の連続する世代の後代によって遺伝することができる。本明細書中で用いられる「ゲノム」は、核ゲノム、ミトコンドリアゲノムおよび色素体ゲノムを含むので、例えば、葉緑体ゲノムまたはミトコンドリアゲノム中への核酸の組込みを含む。また、本明細書中で用いられる安定した形質転換は、例えば微小染色体またはプラスミドとして、染色体外に維持される導入遺伝子を指し得る。
【００７７】
一過性の形質転換は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）またはウェスタンブロットによって検出され得、これらは、生物中に導入される１つまたは複数の導入遺伝子によってコードされるペプチドまたはポリペプチドの存在を検出することができる。細胞の安定した形質転換は、例えば、核酸配列との細胞のゲノムＤＮＡのサザンブロットハイブリダイゼーションアッセイによって検出することができ、これは、生物（例えば植物）中に導入される導入遺伝子のヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズするものである。細胞の安定した形質転換は、例えば、核酸配列との細胞のＲＮＡのノーザンブロットハイブリダイゼーションアッセイによって検出することができ、これは、宿主生物中に導入される導入遺伝子のヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズする。また、細胞の安定した形質転換は、例えば、当該技術において周知のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）または他の増幅反応によって検出することができ、これは、導入遺伝子の標的配列とハイブリダイズする特異的プライマー配列を使用して、導入遺伝子配列の増幅をもたらし、

これが標準的な方法に従って検出され得る。また、形質転換は、当該技術において周知である直接の配列決定および／またはハイブリダイゼーションプロトコールによって検出することができる。

【００７８】

したがって、一部の実施形態において、本発明のヌクレオチド配列、ポリヌクレオチド、核酸構造体、および／または発現カセットは、一過性に発現され得、かつ／または宿主生物のゲノム中に安定して組み込まれ得る。したがって、一部の実施形態において、本発明の核酸構造体（例えば、ＤＮＡ結合ポリペプチドもしくはドメイン、エンドヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメイン、逆転写酵素ポリペプチドもしくはドメイン、フラップエンドヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメイン、および／または核酸修飾ポリペプチドもしくはドメインをコードする１つまたは複数の発現カセット）は、ガイド核酸と共に細胞内に一過的に導入され得るため、細胞内にＤＮＡは維持されない。

【００７９】

本発明の核酸構造体が、当業者に知られているあらゆる方法によって、細胞中に導入され得る。本発明の一部の実施形態において、細胞の形質転換は、核形質転換を含む。他の実施形態において、細胞の形質転換は、色素体形質転換（例えば葉緑体形質転換）を含む。更なる実施形態において、本発明の組換え核酸構造体は、従来的な育種技術を介して細胞中に導入され得る。

【００８０】

真核生物および原核生物の双方を形質転換する手順は、当該技術において周知であり、かつルーチンであり、文献の全体を通して記載されている（例えば、Ｊｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．２０１３．Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１：２３３－２３９、Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ８：２２８１－２３０８（２０１３）参照）。

【００８１】

したがって、ヌクレオチド配列は、当該技術において周知であるいくつもの方法により、宿主生物またはその細胞中に導入することができる。本発明の方法は、１つまたは複数のヌクレオチド配列を生物中に導入するが、生物の少なくとも１つの細胞の内部にアクセスする特定の方法に依存しない。複数のヌクレオチド配列が導入されることとなる場合、これらは、単一の核酸構造体の一部として、または別々の核酸構造体としてアセンブルすることができ、そして同じであるか、または異なる核酸構造体上に位置決めすることができる。したがって、ヌクレオチド配列は、単一の形質転換事象で、および／もしくは別々の形質転換事象で、注目する細胞中に導入することができ、またはこれ以外にも、関連する場合、ヌクレオチド配列は、植物中に、例えば育種プロトコールの一部として、組み込むことができる。

【００８２】

塩基編集は、シトシン残基とアデニン残基をそれぞれチミンとグアニンに変更する効率的な方法であることが示されている。これらのツールは強力であるが、バイスタンダー塩基、小さな塩基編集ウィンドウ、および限定的なＰＡＭなどといった、いくつかの制限がある。

【００８３】

精密な鋳型に基づく編集を細胞中で実行するには、いくつかの重要なステップがあり、それぞれのステップに速度制限があり、効率が低いために、効果的に編集を実行する能力が全体として大幅に妨げられ得る。例えば、あるステップでは、細胞が標的部位で修復イベントを開始するように誘導する必要がある。これは典型的には、外因的に提供される配列特異的なヌクレアーゼまたはニッカーゼによって二本鎖切断（ＤＳＢ）またはニックを引き起こすことによって行われる。別のステップでは、修復に使用される相同鋳型が局所的に利用可能であることが必要とされる。このステップでは、ＤＳＢが鋳型を用いる編集経路にコミットできる正確なタイミングで、鋳型がＤＳＢの近くにある必要がある。特に、このステップは、現在の編集技術の律速段階であると広く考えられている。更なるステップは、鋳型由来の配列を、切断またはニッキングされた標的に効率的に組み込むことで

ある。本発明以前は、このステップは典型的には細胞の内因性ＤＮＡ修復酵素によって提供されていた。このステップの効率は低く、操作が困難である。本発明は、上述のステップを実行するために必要な機能を協調的に共存させることによって、鋳型を用いる編集プロセスの効率に対する主要な障害の多くを回避する。

【００８４】

図１は、本発明の方法および構築体を用いたｃｒＲＮＡの逆転写からのＤＮＡ配列の生成と、その後のニック部位への組込みを示している。伸長されたｃｒＲＮＡは青色で示されており、第２鎖ニッカーゼＣｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）に結合している（ｎＣｐｆ１、左上）。本明細書でより詳細に説明されるように、ｎＣｐｆ１は、例えばペプチドを介して逆転写酵素（ＲＴ）に共有結合されていてもよいし、または（例えば、ペプチドタグに結合するペプチドタグモチーフ／親和性ポリペプチドの使用を介して、または本明細書中に記載の化学的相互作用によって）ＲＴがｎＣｐｆ１に動員されてもよく、その場合、複数の逆転写酵素タンパク質（ＲＴⁿ）が動員されていてもよい。ガイドＲＮＡの３’末端は、ニック部位でＤＮＡと相補的である（非太字の対合線、左上）。その後、ＲＴはＤＮＡニックの３’末端からＤＮＡを重合して、ゲノムに相補的でないヌクレオチド（太字の対合線、括弧、右上）に続いて、相補的なヌクレオチド（非太字の対合線、右上）を持つＲＮＡに相補的なＤＮＡ配列を生成する。解離すると、結果として生じるＤＮＡは、３’オーバーハングを有する伸長されたｓｓＤＮＡを持ち、これは、元のＤＮＡ（非太字の対合線、右下）とほぼ同じ配列であるが、いくつかの非ネイティブのヌクレオチド（太字の対合線、括弧、右下）を有している。このフラップは、ＤＮＡにミスマッチのヌクレオチドが組み込まれた５’オーバーハングを有する構造（左下）と平衡状態にある。この平衡は、右側の有利な完全な対合に偏っているが、例えば、第２の鎖（例えば、非標的鎖またはトップ鎖）をニッキングすることを含む様々な方法で駆動することができる。左側の構造は、哺乳動物細胞と植物細胞の間で高度に保存されているＤＮＡラギング鎖合成に関与する細胞フラップエンドヌクレアーゼによって優先的に切断され得る（ヒト（Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ）ＦＥＮ１のアミノ酸配列は、トウモロコシおよびダイズＦＥＮ１のどちらとも５０％以上同一である）。一部の実施形態において、非ネイティブ／ミスマッチヌクレオチドを含む３’フラップの方向に平衡を駆動するために、フラップエンドヌクレアーゼが導入され得る。真核細胞では、長い５’フラップがＤｎａ２タンパク質によって除去されることが多く、ここでも、３’フラップ（所望）の生成物に平衡が駆動される（例えば、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１２ Ａｕｇ；４０（１４）：６７７４－８６を参照）。

【００８５】

本発明のプロセスにおいてはさらに、図２に例示されているように、ミスマッチ修復を低減し、修飾ヌクレオチド（太字、括弧）を有する最終生成物の形成に有利なように平衡をより駆動するために、Ｃｐｆ１ニッカーゼが、本明細書中に記載のようにＲＴ編集領域（稲妻）の外の領域に標的化され得る。ｎＣｐｆ１：ｃｒＲＮＡ分子は、編集バブルのどちらか一方の側にあっても、両側にあってもよい。第１の鎖（例えば、図２の標的鎖またはボトム鎖）（破線）をニッキングすることは、ミスマッチ修復および複製の際に新たに組み込まれたヌクレオチドが正しいヌクレオチドであることを細胞に示し、したがって、新たなヌクレオチドを有する最終生成物に有利となる。

【００８６】

逆転写酵素（ＲＴ）の変異体は、編集系の温度感受性と処理能力に有意な影響を与え得る。ＲＴの天然および合理的および非合理的に操作（つまり、指向性進化）された変異体は、植物が好む温度での活性の最適化および処理能力プロファイルの最適化に役立ち得る。

【００８７】

ＲＴポリペプチドへのタンパク質ドメインの融合は、編集系の温度感受性と処理能力に有意な影響を与え得る。ＲＴ酵素は、ｓｓＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）との融合により、温度感受性、処理能力、および鋳型親和性について改善され得る。これらのＲＢＤは、

配列特異性、非特異性、または配列優先性を有し得る（例えば、配列番号３７～５２参照）。様々な親和性分布は、異なる細胞内およびｉｎ　ｖｉｔｒｏの環境において編集に有益となり得る。ＲＢＤは、より多くのヌクレオチドまたはより少ないヌクレオチドを認識するために、ＲＢＤのサイズを増減することにより、特異性と結合自由エネルギーの両方が修飾され得る。複数のＲＢＤにより、個々のＲＢＤの組合せである親和性分布を持つタンパク質がもたらされる。ＲＴ酵素に１つまたは複数のＲＢＤを追加すると、親和性の増加、配列特異性の増加または減少、および／または協同性の促進がもたらされ得る。

【００８８】

本発明で使用するためのＲＴポリペプチドは、一本鎖ＲＮＡ結合タンパク質（ＲＢＤ）と融合されてもよい。本発明で有用なＲＢＤは、例えば、ヒト、マウス、またはハエから得られるＲＢＤであり得る。一本鎖結合タンパク質は、配列番号３７～５２のいずれか１つを含むが、これらに限定されないアミノ酸配列を含み得る。

【００８９】

逆転写酵素が編集をゲノムに組み込んだ後、新しく合成された編集された配列と、置換する予定の元のＷＴ配列の間に配列の冗長性が生じる。これにより、標的部位に５’または３’フラップが生じるが、これは細胞によって修復される必要がある。平衡状態においては２つの状態が存在し、ＷＴ配列がその相補体と対合している場合、編集された鎖がその相補体と対合している場合よりも多くの塩基対が利用できるため、結合エネルギーは３’フラップに有利である。これは、３’フラップの処理（除去）により編集された残基が除去され、標的がＷＴ配列に戻る可能性があるため、効率的な編集には好ましくない。しかしながら、ＦＥＮ１またはＤｎａ２などの細胞性フラップエンドヌクレアーゼは、５’フラップを効率的に処理できる。したがって、細胞に固有の５’－フラップエンドヌクレアーゼの機能に依存する代わりに、本発明の一部の実施形態においては、所望の平衡結果（編集された配列が標的部位に安定的に組み込まれるような５’フラップ中のＷＴ配列の除去）をさらに有利にするために、標的におけるフラップエンドヌクレアーゼの濃度が高められてもよい。これは、細胞中における遊離タンパク質としての５’フラップエンドヌクレアーゼの過剰発現によって達成され得る。あるいは、ＦＥＮまたはＤｎａ２は、直接的なタンパク質融合、またはペプチドタグと親和性ポリペプチドの対（例えば、ＳｕｎＴａｇ抗体／エピトープの対など）もしくは本明細書中に記載の化学的相互作用などといった非共有結合的な動員のいずれかによるＣＲＩＳＰＲ複合体との結合によって、標的部位に積極的に動員されてもよい。

【００９０】

本発明はさらに、本発明のタンパク質／ポリペプチド、および／または融合タンパク質、ならびにそれをコードするポリヌクレオチドおよび核酸構造体、ならびに／またはそれを含む発現カセットおよび／もしくはベクターを使用して、標的核酸を修飾するための方法を提供する。本方法は、ｉｎ　ｖｉｖｏ系（例えば、細胞内もしくは生物内）またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ系（例えば、無細胞）において実施され得る。よって、一部の実施形態において、標的核酸を（ａ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；（ｂ）逆転写酵素、ならびに（ｃ）拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ；例えば、ｔａｇＲＮＡ、ｔａｇＤＮＡ）に接触させることを含み、それによって標的核酸を修飾する、植物細胞において標的核酸を修飾する方法が提供される。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、逆転写酵素、および拡張ガイド核酸は、標的核酸と相互作用できる複合体を形成し得るか、または複合体中に含まれ得る。一部の実施形態において、本発明の方法は、標的核酸を（ａ）第２のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質または第２のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；（ｂ）第２の逆転写酵素、および（ｃ）第２の拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ；例えば、ｔ

ａｇＤＮＡ、ｔａｇＲＮＡ）に接触させることをさらに含んでいてもよく、ここで、第２の拡張ガイド核酸は、標的核酸の第１の鎖上の部位を標的化し（スペーサーが標的核酸の第１の鎖上の部位に実質的に相補的であり／結合し）、それによって標的核酸を修飾する。一部の実施形態において、本発明の方法は、標的核酸を（ａ）第２のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質または第２のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；（ｂ）第２の逆転写酵素、および（ｃ）第２の拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ；例えば、ｔａｇＤＮＡ、ｔａｇＲＮＡ）に接触させることをさらに含んでいてもよく、ここで、第２の拡張ガイド核酸は、標的核酸の第２の鎖上の部位を標的化し（スペーサーが標的核酸の第２の鎖上の部位に実質的に相補的であり／結合し）、それによって標的核酸を修飾する。一部の実施形態において、本発明の方法は、約２０℃から４２℃（例えば、約２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、または４２℃、およびその中の任意の値または範囲）の温度で標的核酸を接触させることを含む。一部の実施形態においては、ミスマッチ修復を改善するために、標的核酸を追加のポリペプチドおよび／またはそれをコードする核酸構造体と接触させてもよい。一部の実施形態において、本発明の方法は、標的核酸を（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；および（ｂ）ガイド核酸と接触させることをさらに含んでいてもよく、ここで、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質はニッカーゼ（例えば、ｎＣａｓ９、ｎＣａｓ１２ａ）であり、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質によってニッキングされた第２の鎖上の部位から５’または３’のいずれかの向きに約１０から約１２５塩基対（例えば、約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４もしくは１２５塩基対、またはその中の任意の範囲もしくは値）に位置する標的核酸の第１の鎖上の部位にニッキングするか、または（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質はニッカーゼ（例えば、ｎＣａｓ９、ｎＣａｓ１２ａ）であり、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質によりニッキングされた第１の鎖上の部位から約１０から約１２５塩基対（５’または３’のいずれか）に位置する標的核酸の第２の鎖上の部位にニッキングし、それによってミスマッチ修復が改善される。一部の実施形態において、標的核酸の第２の鎖（非標的鎖）をニッキングすることは、ミスマッチを有するスペーサーを含むｃｒＲＮＡと標的核酸を接触させることを含む（例えば、約１、２、３、または４個のミスマッチ；例えば、第２鎖（非標的鎖）に対して約８０～９６％相補的）。この構成では、ニッキングは平衡を変化させないが、５’フラップが細胞内で優先的に処理されるため、むしろミスマッチ産物種の形成が促進される。非標的鎖のニッキングにより、ミスマッチ修復が関与する次のステップの分解能が向上する。

【００９１】

したがって、一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質を正しい場所にガイドし、完全なＲＮＡ：ＤＮＡマッチを用いて二本鎖切断を行うｔａｇＲＮＡと、同じ鎖のすぐ近くでＤＮＡにアニールする第２のＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）という、少なくとも２つのＲＮＡが、本発明の方法で利用され得る。この第２のＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）は、いくつかのミスマッチ（完全には相補的ではない、例えば約１、２、３、または４個のミスマッチ、例えば、約８０％から約９６％（８０、８１、８２、８３、８４、

８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６％）の相補性）を含むスペーサー配列を有する。これは、非標的鎖をニッキングするＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をもたらす。いかなる特定の理論にも限定されることは意図しないが、ニッキングの後、非標的鎖の一部を噛み戻す（ｃｈｅｗ　ｂａｃｋ）細胞ヌクレアーゼが存在すると考えられる。非標的鎖がなければ、本発明の方法（ＲＥＤＲＡＷ）を用いて行っている編集を「修理」するための青写真が存在せず、その結果、編集効率が向上する。この構成では、融合酵素は１つだけ使用されるが、２つの異なるＲＮＡ（ｔａｇＲＮＡとｃｒＲＮＡ）に結合できる。

【００９２】

一部の実施形態において、拡張ガイド核酸は、（ｉ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ核酸もしくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ）、および／またはＣＲＩＳＰＲ核酸とｔｒａｃｒ核酸（例えば、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＤＮＡ）；ならびに（ｉｉ）プライマー結合部位および逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）を含む拡張部分を含む。一部の実施形態において、拡張部分は、前記ＣＲＩＳＰＲ核酸の５’末端または３’末端のいずれか（例えば、５’から３’の向き：反復－スペーサー－拡張部分、または拡張部分－反復－スペーサー）、および／または前記ｔｒａｃｒ核酸の５’もしくは３’末端に融合され得る。一部の実施形態において、拡張ガイド核酸の拡張部分は、５’から３’の向きにＲＴ鋳型（ＲＴＴ）およびプライマー結合部位（ＰＢＳ）を含む（例えば、５’－ｃｒＲＮＡ－スペーサー－ＲＴＴ（編集コードされている）－ＰＢＳ－３’）、またはガイドのＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡに対する拡張部分の位置に応じて、５’から３’の向きにＰＢＳおよびＲＴＴを含む（例えば、５’－ｃｒＲＮＡ－スペーサー－ＰＢＳ－ＲＴＴ（編集コードされている）－３’）。一部の実施形態において、標的核酸は二本鎖であり、第１鎖および第２鎖を含み、プライマー結合部位は、標的核酸の第２鎖（非標的、トップ鎖）に結合する。一部の実施形態において、標的核酸は二本鎖であり、第１鎖および第２鎖を含み、プライマー結合部位は標的核酸の第１鎖に結合する（例えば、標的の鎖、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質がリクルートされる鎖と同じ鎖、ボトム鎖に結合する）。一部の実施形態において、標的核酸は二本鎖であり、第１鎖および第２鎖を含み、プライマー結合部位は標的核酸の第２鎖（非標的鎖、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質がリクルートされる鎖とは反対の鎖）に結合する。したがって、一部の実施形態において、編集を行う逆転写酵素（ＲＴ）は、標的鎖（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡのスペーサーが相補的であり、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が動員される鎖）に付加し、そして一部の実施形態において、編集を行う逆転写酵素（ＲＴ）は、非標的鎖（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡのスペーサーが相補的であり、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が動員される鎖に相補的な鎖）に付加する。

【００９３】

ＲＴ鋳型は、標的核酸中に組み込まれる修飾（編集）をコードする。編集部の修飾は、ＲＴ鋳型内の任意の位置（標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置に相対的な位置）に配置され得る。したがって、例えば、図２７は、標的核酸中のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）（ＴＴＴＧ）の位置に対して、－１～１９位（－１、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、２７、１８または１９）に位置する編集部を有するＲＴ鋳型を示している。いずれの場合も、精密な編集が観察された。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、－１、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、２７、１８、または１９位のヌクレオチド位置に位置する編集部を含み得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置に対するＲＴ鋳型の４位のヌクレオチド位置から１７位のヌクレオチド位置（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、または１７位）に位置する編集部を含み得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチ

ーフ（ＰＡＭ）の位置に対するＲＴ鋳型の１０位のヌクレオチド位置から１７位のヌクレオチド位置（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、または１７位）に位置する編集部を含み得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置に対するＲＴ鋳型の１２位のヌクレオチド位置から１５位のヌクレオチド位置（例えば、１２、１３、１４、または１５位）に位置する編集部を含み得る。

【００９４】

一部の実施形態においては、第１鎖および第２鎖を有する標的核酸を修飾する方法が提供され、本方法は、標的核酸を、（ａ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；（ｂ）逆転写酵素、および（ｃ）拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、拡張ＩＩ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ）と接触させることを含み、ここで、拡張ガイド核酸は、（ｉ）ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ）ならびに／またはＣＲＩＳＰＲ核酸およびｔｒａｃｒ核酸（例えば、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＤＮＡ）；ならびに（ｉｉ）プライマー結合部位および逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）を含む拡張部分を含み、そして、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸は、第１の鎖（例えば、標的鎖）に結合する（すなわち、標的核酸の第１の鎖の連続するヌクレオチドの一部と相補的である）スペーサーを含み、プライマー結合部位は、第１の鎖（標的鎖）に結合し、それによって標的核酸を修飾する。一部の実施形態において、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質はＣａｓ９ポリペプチド、場合によってはｓｐＣａｓ９であり得る。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ１２ａポリペプチドまたはｃａｓ１２ｂポリペプチドであり得る。一部の実施形態において、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、逆転写酵素、および拡張ガイド核酸は、複合体を形成することができるか、または複合体中に含まれている。一部の実施形態において、接触させることは、標的核酸を５’－３’エキソヌクレアーゼと接触させることをさらに含み得る。

【００９５】

一部の実施形態において、標的核酸はさらに、５’フラップエンドヌクレアーゼ（ＦＥＮ）、場合によってはＦＥＮ１および／またはＤｎａ２ポリペプチドと接触させられてもよく、それによって、標的核酸に組み込まれる編集部を含まない５’フラップを除去することによりミスマッチ修復を改善することができる。一部の実施形態において、ＦＥＮおよび／またはＤｎａ２は、標的核酸の存在下で過剰発現され得る。一部の実施形態において、ＦＥＮは、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはドメインに融合されたＦＥＮドメインを含む融合タンパク質であってもよく、それによってＦＥＮが標的核酸に動員される。

【００９６】

一部の実施形態において、Ｄｎａ２は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはドメインに融合されたＤｎａ２ドメインを含む融合タンパク質であってもよく、それによってＤｎａ２を標的核酸に動員する。

【００９７】

一部の実施形態において、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、また、ＦＥＮは、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＦＥＮドメインを含むＦＥＮ融合タンパク質であってもよく、それによってＦＥＮをＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメイン、および標的核酸に動員する。一部の実施形態において、ＩＩ型

またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、また、Ｄｎａ２は、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＤｎａ２ドメインを含むＤｎａ２融合タンパク質であってもよく、それによってＤｎａ２をＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメイン、および標的核酸に動員する。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、また、ＦＥＮは、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＦＥＮドメインを含むＦＥＮ融合タンパク質であってもよく、それによってＦＥＮをＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメイン、および標的核酸に動員する。一部の実施形態において、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、また、Ｄｎａ２は、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＤｎａ２ドメインを含むＤｎａ２融合タンパク質であってもよく、それによってＤｎａ２をＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメイン、および標的核酸に動員する。一部の実施形態においては、標的核酸を２つ以上のＦＥＮ融合タンパク質および／またはＤｎａ２融合タンパク質と接触させてもよい。

【００９８】

一部の実施形態において、本発明の方法は、標的核酸を５’－３’エキソヌクレアーゼと接触させることをさらに含んでもよく、それによって標的核酸に組み込まれる編集部（編集されない鎖）を含まない５’フラップを除去することによりミスマッチ修復を改善する。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、場合によってはＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質に融合されていてもよい。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ペプチドタグに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であってもよく、そして、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質であってもよく、それによってミスマッチ修復を改善する。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ペプチドタグと結合できる親和性ポリペプチドと融合した５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であってもよく、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質であってもよい。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ＲＮＡ動員モチーフに結合できる親和性ポリペプチドに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であってもよく、拡張ガイド核酸はＲＮＡ動員モチーフに連結されており、それによって、親和性ポリペプチドとＲＮＡ動員モチーフとの間の相互作用を介して、５’－３’エキソヌクレアーゼを標的核酸へと動員する。５’－３’エキソヌクレアーゼは、注目する生物、細胞またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ系で機能する既知または後に発見される５’－３’エキソヌクレアーゼであり得る。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ＲｅｃＥエキソヌクレアーゼ（ＲｅｃＥ、例えば、配列番号１２９）、ＲｅｃＪエキソヌクレアーゼ（ＲｅｃＪ、例えば、配列番号１３０）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ（Ｔ５＿Ｅｘｏ、例えば、配列番号１３１）、および／またはＴ７エキソヌクレアーゼ（Ｔ７＿Ｅｘｏ、例えば、配列番号１３２）、ラムダエキソヌクレアーゼ（Ｌａｍｂｄａ＿Ｅｘｏ、例えば、配列番号１３３）、大腸菌エキソヌクレアーゼｓｂｃＢ（配列番号１３４）および

／またはヒトエキソヌクレアーゼ（Ｅｘｏ、例えば配列番号１３５）を含み得るが、これらに限定はされない。一部の実施形態においては、例えば、大腸菌（Ｋ１２株）由来の核局在化配列（ＮＬＳ）が両側に隣接するＲｅｃＥエキソヌクレアーゼＣ末端断片が使用されてもよい（配列番号９８）。一部の実施形態においては、例えば、大腸菌（Ｋ１２株）由来の核局在化配列（ＮＬＳ）が両側に隣接するＲｅｃＪエキソヌクレアーゼが使用されてもよい（配列番号９９）。一部の実施形態においては、両側に核局在化配列（ＮＬＳ）が隣接するＴ５エキソヌクレアーゼが使用されてもよい（配列番号１００）。一部の実施形態においては、例えば、エシェリヒアファージ７由来の核局在化配列（ＮＬＳ）が両側に隣接するＴ７エキソヌクレアーゼが使用されてもよい（配列番号１０１）。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ＲｅｃＥ（例えば、配列番号１２９）、ＲｅｃＪ（例えば、配列番号１３０）、Ｔ５＿Ｅｘｏ（例えば、配列番号１３１）、Ｔ７＿Ｅｘｏ（例えば、配列番号１３２）、ｓｂｃＢ（配列番号１３４）および／またはＥｘｏ（配列番号１３５）を含むが、これらに限定はされない。

【００９９】

一部の実施形態において、本発明の方法は、二本鎖切断を低減することをさらに含み得る。一部の実施形態において、二本鎖切断の低減は、標的核酸の領域に、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）の化学的阻害剤を導入することによって、またはＣＲＩＳＰＲガイド核酸もしくはＮＨＥＪタンパク質を標的とするｓｉＲＮＡを導入してＮＨＥＪタンパク質の発現を一過的にノックダウンすることによって実施され得る。一部の実施形態において、ＮＪＥＨの阻害剤は、本発明の逆転写酵素（ＲＴ）またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に、場合によってはＲＴまたはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＮ末端に融合され得る。一部の実施形態において、ＮＨＥＪの阻害剤は、エシェリヒアファージＭｕ　Ｇａｍ（配列番号１４７）を含むが、これに限定はされない。

【０１００】

一部の実施形態において、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、融合タンパク質であってもよく、および／または逆転写酵素は、融合タンパク質であってもよく、ここで、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質、逆転写酵素融合タンパク質および／または拡張ガイド核酸は、１つまたは複数の成分と融合されていてもよく、これは、逆転写酵素をＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に動員することを可能にする。一部の実施形態において、１つまたは複数の成分は、タンパク質－タンパク質相互作用、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、および／または化学的相互作用を介して動員する。

【０１０１】

したがって、一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量化エピトープ）に融合（連結）されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクター融合タンパク質であってもよく、逆転写酵素は、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合（連結）された逆転写酵素ドメインを含む逆転写酵素融合タンパク質であってもよく、ここで、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳエフェクタータンパク質はガイド核酸と相互作用し、このガイド核酸は標的核酸に結合し、それによって逆転写酵素をＶ型ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳエフェクタータンパク質と標的核酸に動員する。一部の実施形態において、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグ（例えば、エピトープまたは多量体化エピトープ）に融合（連結）されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であり、ＦＥＮは、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＦＥＮドメインを含むＦＥＮ融合タンパク質であり、および／またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグに融合されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であり、Ｄｎａ２ポリペプチドは、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドに融合されたＤｎａ２ドメインを含むＤｎａ２融合タンパク質であり、場合によっては、標的核酸

は、２つ以上のＦＥＮ融合タンパク質および／または２つ以上のＤｎａ２融合タンパク質と接触させられ、それによって、ＦＥＮおよび／またはＤｎａ２がＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインおよび標的核酸に動員される。一部の実施形態においては、２つ以上の逆転写酵素融合タンパク質が、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に動員されてもよく、それによって標的核酸を２つ以上の逆転写酵素融合タンパク質と接触させる。

【０１０２】

ペプチドタグは、ＧＣＮ４ペプチドタグ（例えば、Ｓｕｎ－Ｔａｇ）、ｃ－Ｍｙｃ親和性タグ、ＨＡ親和性タグ、Ｈｉｓ親和性タグ、Ｓ親和性タグ、メチオニン－Ｈｉｓ親和性タグ、ＲＧＤ－Ｈｉｓ親和性タグ、ＦＬＡＧオクタペプチド、ｓｔｒｅｐタグまたはｓｔｒｅｐタグＩＩ、Ｖ５タグ、および／またはＶＳＶ－Ｇエピトープを含み得るが、これらに限定はされない。ポリペプチドに連結され得るエピトープであって、別のポリペプチドに連結され得る対応する親和性ポリペプチドが存在するものであれば、本発明で使用され得る。一部の実施形態において、ペプチドタグは、１または２以上のコピーのペプチドタグ（例えば、エピトープ、多量体化エピトープ（例えば、タンデム反復））（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５以上のペプチドタグ）を含み得る。一部の実施形態において、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドは、抗体であり得る。一部の実施形態において、抗体はｓｃＦｖ抗体であり得る。一部の実施形態において、ペプチドタグに結合する親和性ポリペプチドは、アフィボディ、アンチカリン、モノボディおよび／またはＤＡＲＰｉｎを含むが、これらに限定はされない合成物（例えば、親和性相互作用について進化させたもの）であってもよい（例えば、Ｓｈａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．２６（５）：９１０－９２４（２０１７））；Ｇｉｌｂｒｅｔｈ（Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｓｔｒｕｃ　Ｂｉｏｌ　２２（４）：４１３－４２０（２０１３））、米国特許第９，９８２，０５３号を参照。これらの各々はアフィボディ、アンチカリン、モノボディおよび／またはＤＡＲＰｉｎに関連する教示について、その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする）。例示的なペプチドタグ配列およびその親和性ポリペプチドは、配列番号２３～２５のアミノ酸配列を含むが、これらに限定はされない。

【０１０３】

一部の実施形態において、拡張ガイド核酸は、ＲＮＡ動員モチーフに連結されていてもよく、逆転写酵素は、逆転写酵素融合タンパク質であってもよく、ここで、逆転写酵素融合タンパク質は、ＲＮＡ動員モチーフに結合する親和性ポリペプチドに融合した逆転写酵素ドメインを含んでいてもよく、ここで、拡張ガイドは標的核酸に結合し、ＲＮＡ動員モチーフは親和性ポリペプチドに結合し、それによって逆転写酵素融合タンパク質が拡張ガイドへと動員され、標的核酸を逆転写酵素ドメインに接触させる。一部の実施形態において、２つ以上の逆転写酵素融合タンパク質が、拡張ガイド核酸に動員されてもよく、それによって標的核酸を２つ以上の逆転写酵素融合タンパク質に接触させる。例示的なＲＮＡ動員モチーフおよびその親和性ポリペプチドは、配列番号２６～３６の配列を含むが、これらに限定はされない。

【０１０４】

一部の実施形態において、ＲＮＡ動員モチーフは、拡張ガイド核酸の拡張部分の３’末端に位置し得る（例えば、５’－３’、反復－スペーサー－拡張部分（ＲＴ鋳型－プライマー結合部位）－ＲＮＡ動員モチーフ）。一部の実施形態では、ＲＮＡ動員モチーフは、拡張部分に埋め込まれていてもよい。

【０１０５】

本発明の一部の実施形態において、拡張ガイドＲＮＡおよび／またはガイドＲＮＡは、１つまたは２つ以上のＲＮＡ動員モチーフ（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０以上のモチーフ、例えば、少なくとも１０から約２５モチーフ）に連結されていてもよく、場合によっては２以上のＲＮＡ動員モチーフは、同じＲＮＡ動員モチーフまた

は異なるＲＮＡ動員モチーフであってもよい。一部の実施形態において、ＲＮＡ動員モチーフおよび対応する親和性ポリペプチドは、テロメラーゼＫｕ結合モチーフ（例えば、Ｋｕ結合ヘアピン）および対応する親和性ポリペプチドＫｕ（例えば、Ｋｕヘテロダイマー）、テロメラーゼＳｍ７結合モチーフおよび対応する親和性ポリペプチドＳｍ７、ＭＳ２ファージオペレーターステムループおよび対応する親和性ポリペプチドＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）、ＰＰ７ファージオペレーターステムループおよび対応する親和性ポリペプチドＰＰ７コートタンパク質（ＰＣＰ）、ＳｆＭｕファージＣｏｍステムループおよび対応する親和性ポリペプチドＣｏｍ　ＲＮＡ結合タンパク質、ＰＵＦ結合部位（ＰＢＳ）および親和性ポリペプチドＰｕｍｉｌｉｏ／ｆｅｍ－３　ｍＲＮＡ結合因子（ＰＵＦ）、および／または合成ＲＮＡ－アプタマーおよび対応する親和性ポリペプチドとしてのアプタマーリガンドを含み得るが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、ＲＮＡ動員モチーフおよび対応する親和性ポリペプチドは、ＭＳ２ファージオペレーターステムループおよび親和性ポリペプチドＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）であってもよい。一部の実施形態において、ＲＮＡ動員モチーフおよび対応する親和性ポリペプチドは、ＰＵＦ結合部位（ＰＢＳ）および親和性ポリペプチドＰｕｍｉｌｉｏ／ｆｅｍ－３ｍＲＮＡ結合因子（ＰＵＦ）であってもよい。

【０１０６】

一部の実施形態において、ポリペプチドおよび核酸を動員するための成分は、ＦＲＢ－ＦＫＢＰのラパマイシン誘導性二量化；ビオチン－ストレプトアビジン；ＳＮＡＰタグ；Ｈａｌｏタグ；ＣＬＩＰタグ；化合物によって誘導されるＤｍｒＡ－ＤｍｒＣヘテロダイマー；二機能性リガンド（例えば、２つのタンパク質結合性化学物質を一緒に融合したもの、例えばジヒドロフォレート還元酵素（ＤＨＦＲ））を含み得るが、これらに限定はされない、化学的相互作用を通して機能するものであり得る。

【０１０７】

本発明の一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、第３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、および／または第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質）は、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系、ＩＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系および／またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に由来するものであり得る。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に由来するものである。

【０１０８】

本発明の一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ９、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１とも呼ばれる）、Ｃａｓ１２ｂ、Ｃａｓ１２ｃ、Ｃａｓ１２ｄ、Ｃａｓ１２ｅ、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、Ｃａｓ１３ｄ．Ｃａｓｌ、ＣａｓｌＢ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ３’、Ｃａｓ３”、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（ＣｓｎｌおよびＣｓｘ１２としても知られる）、Ｃａｓ１０、Ｃｓｙｌ、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅｌ、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃｌ、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒｌ、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂｌ、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘｌ７、Ｃｓｘｌ４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘｌ、Ｃｓｘｌ５、Ｃｓｆｌ、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４（ｄｉｎＧ）、および／またはＣｓｆ５ヌクレアーゼであってもよく、場合によってはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）、Ｃａｓ１２ｂ、Ｃａｓ１２ｃ（Ｃ２ｃ３）、Ｃａｓ１２ｄ（ＣａｓＹ）、Ｃａｓ１２ｅ（ＣａｓＸ）、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、Ｃａｓ１２ｉ、Ｃ２ｃ４、Ｃ２ｃ５、Ｃ２ｃ８、Ｃ２ｃ９、Ｃ２ｃ１０、Ｃａｓ１４ａ、Ｃａｓ１４ｂ、および／またはＣａｓ１４ｃヌクレアーゼであり得る。

【０１０９】
一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ニッカーゼとして機能するタンパク質（例えば、Ｃａｓ９ニッカーゼまたは Ｃａｓ１２ａニッカーゼ）であってもよい。一部の実施形態において、本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、そのヌクレアーゼ活性部位（例えば、ＲｕｖＣ、ＨＮＨ、例えば、Ｃａｓ１２ａヌクレアーゼドメインの ＲｕｖＣ部位、例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメインのＲｕｖＣ部位および／またはＨＮＨ部位）に変異を含んでいてもよい。ヌクレアーゼ活性部位に変異を有し、それゆえヌクレアーゼ活性を持たなくなったＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、一般に「死んだ」または「不活化した」、例えば、ｄＣａｓと呼ばれる。一部の実施形態において、そのヌクレアーゼ活性部位に変異を有するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼドメインまたはポリペプチドは、変異のない同じＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼと比較して、損なわれた活性または低減した活性を有し得る。一部の実施形態において、本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、二本鎖ヌクレアーゼであり得る。一部の実施形態において、二本鎖ヌクレアーゼ活性を有するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質であり得る。一部の実施形態において、二本鎖ヌクレアーゼ活性を有するＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ１２ａポリペプチドである。一部の実施形態において、二本鎖ヌクレアーゼ活性を有するＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ９ポリペプチドである。

【０１１０】
一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質であり得る。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）、Ｃａｓ１２ｂ（Ｃ２ｃ１）、Ｃａｓ１２ｃ（Ｃ２ｃ３）、Ｃａｓ１２ｄ（ＣａｓＹ）、Ｃａｓ１２ｅ（ＣａｓＸ）、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、Ｃａｓ１２ｉ、Ｃ２ｃ４、Ｃ２ｃ５、Ｃ２ｃ８、Ｃ２ｃ９、Ｃ２ｃ１０、Ｃａｓ１４ａ、Ｃａｓ１４ｂ、および／またはＣａｓ１４ｃのエフェクタータンパク質および／またはドメインを含み得る。

【０１１１】
一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）は、ＬｂＣａｓ１２ａ、Ｌｂ２Ｃａｓ１２ａ、Ｌｂ３Ｃａｓ１２ａ、ＡｓＣａｓ１２ａ、ＢｐＣａｓ１２ａ、ＣＭｔＣａｓ１２ａ、ＥｅＣａｓ１２ａ、ＦｎＣａｓ１２ａ、ＬｉＣａｓ１２ａ、ＭｂＣａｓ１２ａ、ＰｂＣａｓ１２ａ、ＰｃＣａｓ１２ａ、ＰｄＣａｓ１２ａ、ＰｅＣａｓ１２ａ、ＰｍＣａｓ１２ａ、ＳｓＣａｓ１２ａ、ｅｎＡｓＣａｓ１２ａを含み得るが、これらに限定はされず、場合によってはＣａｓ１２ａは、本明細書中に記載の１つまたは複数の変異を含む。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ｂ（Ｃ２ｃ１）は、ＢｈＣａｓ１２ｂを含み得るが、これに限定はされず、場合によってはＣａｓ１２ｂは、本明細書中に記載の１つまたは複数の変異を含む。

【０１１２】
一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、アシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）由来（ＡｓＣａｓ１２ａ）、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ）細菌由来（例えば、ＬｂＣａｓ１２ａ）、またはブチリビブリオ・ヒュンガティ（Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ　ｈｕｎｇａｔｅｉ）由来（ＢｈＣａｓ１２ｂ）のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、またはその修飾Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質を含み得るが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、アシダミノコッカス属由来のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、配列番号２に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み得る。一部の実施形態において、ラクノスピラ科細菌由来のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、配列番号１、配列番号７、配列番号８、または配列番号９のいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態において、ブチリビブリオ・ヒュンガティ由来のＶ型ＣＲＩＳ

ＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、配列番号１５１のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み得る。一部の実施形態において、アシダミノコッカス属由来の修飾Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号１４９、または配列番号１５０のいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態において、ラクノスピラ科細菌由来の修飾Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、配列番号１４８と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み得る。

【０１１３】

一部の実施形態において、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ９エフェクタータンパク質を含み得るが、これに限定はされず、場合によっては、Ｃａｓ９エフェクタータンパク質は連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）由来、場合によっては化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のものであり得る。一部の実施形態において、Ｃａｓ９エフェクタータンパク質は、修飾Ｃａｓ９エフェクタータンパク質であってもよい。一部の実施形態において、Ｃａｓ９エフェクタータンパク質は、配列番号１０６または配列番号１０７のいずれか１つと少なくとも８０％の同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。一部の実施形態において、Ｃａｓ９エフェクタータンパク質は、配列番号１０８～１２２のいずれか１つに対して少なくとも８０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列によってコードされ得る。

【０１１４】

一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ核酸のみを利用するエフェクタータンパク質を含み得る。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と同様に、ＣＲＩＳＰＲ核酸とトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ（ｔｒａｃｒ）核酸の両方を利用するエフェクタータンパク質を含み得る。したがって、一部の実施形態において、本発明で有用なＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、対応するＣＲＩＳＰＲ核酸のみ（例えば、Ｃａｓ１２ａ、Ｃａｓ１２ｉ、Ｃａｓ１２ｈ、Ｃａｓ１４ｂ、Ｃａｓ１４ｃ、Ｃ２ｃ１０、Ｃ２ｃ９、Ｃ２ｃ８、Ｃ２ｃ４）で機能し得る。一部の実施形態において、本発明で有用なＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、対応するＣＲＩＳＰＲ核酸およびｔｒａｃｒ核酸（例えば、Ｃａｓ１２ｂ、Ｃａｓ１２ｃ、Ｃａｓ１２ｅ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１４ａ）と共に機能し得る。

【０１１５】

本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ核酸は、対応するＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質と相互作用できる少なくとも１つの反復配列、および少なくとも１つのスペーサー配列を含んでいてもよく、ここで、少なくとも１つのスペーサー配列は、標的核酸（例えば、標的核酸の第１の鎖または第２の鎖）に結合することができる。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ核酸の反復配列は、スペーサー配列の５’に位置し得る。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ核酸は、１つより多い反復配列を含んでいてもよく、反復配列は、スペーサーの５’末端および３’末端の両方に連結される。一部の実施形態において、本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ核酸は、２つ以上の反復配列および１つまたは複数のスペーサー配列を含んでいてもよく、ここで、各スペーサー配列は、５’末端および３’末端で反復配列と連結している。

【０１１６】

本発明で有用なｔｒａｃｒ核酸は、対応するＣＲＩＳＰＲ核酸の反復配列に実質的に相補的でハイブリダイズする第１の部分、および対応するＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質と相互作用する第２の部分を含み得る。

【０１１７】

一部の実施形態において、本発明に有用なＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、二本鎖ＤＮＡヌクレアーゼとして機能し得る。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、一本鎖ＤＮＡニッカーゼとして機能してもよく、場合によっては第１の鎖がニッキングされる。一部の実施形態において、Ｖ型

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、一本鎖ＤＮＡニッカーゼとして機能してもよく、場合によっては第２の鎖がニッキングされる。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ニッカーゼとして機能するＣａｓ１２ａエフェクタータンパク質であってもよく、場合によっては第１の鎖（標的鎖）がニッキングされる。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ニッカーゼとして機能するＣａｓ１２ａエフェクタータンパク質であってもよく、場合によっては第２の鎖がニッキングされる。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、戦略的なミスマッチを含むｃｒＲＮＡの使用を通じて、ニッカーゼとして機能するＣａｓ１２ａエフェクタータンパク質であり得る。したがって、例えば、ｃｒＲＮＡは、１から約４個のミスマッチ（例えば、１、２、３、または４個のミスマッチ）を有するスペーサー（例えば、８０～９６％相補的）を含み得る。

【０１１８】

一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ａエフェクタータンパク質は、ＬＱＭＲＮＳモチーフ中にアルギニンの変異を有するＣａｓ１２ａニッカーゼであり得る。このモチーフ中のアルギニンの変異は任意のアミノ酸へのものであってもよく、それによってＣａｓ１２ａニッカーゼが提供される。一部の実施形態において、変異はアラニンへのものであり得る。一部の実施形態において、変異は、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンへのものであり得る。一部の実施形態において、変異は、アラニンへの変異であってもよい。一部の実施形態において、変異は、リジンまたはヒスチジンへの変異を含まない。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ａエフェクタータンパク質は、Ｒ１１３８、場合によってはＲ１１３８Ａ変異（参照ヌクレオチド配列の配列番号９を参照）、Ｒ１１３７変異、場合によってはＲ１１３７Ａ変異（参照ヌクレオチド配列の配列番号１を参照）、またはＲ１１２４変異、場合によってはＲ１１２４Ａ変異（参照ヌクレオチド配列の配列番号７を参照）を含むＬｂＣａｓ１２ａニッカーゼであってもよい。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ａエフェクタータンパク質は、Ｒ１２２６変異、場合によってはＲ１２２６Ａ変異を含むＡｓＣａｓ１２ａニッカーゼであり得る（参照ヌクレオチド配列の配列番号２を参照）。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ａエフェクタータンパク質は、Ｒ１２１８変異、場合によってはＲ１２１８Ａ変異を含むＦｎＣａｓ１２ａニッカーゼであり得る（参照ヌクレオチド配列の配列番号６を参照）。一部の実施形態において、Ｃａｓ１２ａエフェクタータンパク質は、Ｒ１２４１変異、場合によってはＲ１２４１Ａ変異を含むＰｄＣａｓ１２ａニッカーゼであり得る（参照ヌクレオチド配列の配列番号１４を参照）。

【０１１９】

一部の実施形態において、本発明で有用なＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、低減された一本鎖ＤＮＡ切断活性（ｓｓＤＮＡｓｅ活性）を含んでいてもよい（例えば、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ｓｓＤＮＡｓｅ活性を低減させるために修飾（変異）され得る（例えば、野生型または非修飾のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質よりも約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％低いｓｓＤＮＡｓｅ活性））。

【０１２０】

一部の実施形態において、本発明で有用なＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、低減された自己処理ＲＮＡｓｅ活性を含んでいてもよい（例えば、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、自己処理ＲＮＡｓｅ活性を低減するように修飾（変異）され得る（例えば、野生型または非修飾のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質よりも約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％低い自己処理ＲＮＡｓｅ活性））。一部の実施形態において、自己処理ＲＮＡｓ

ｅ活性を低減するための変異は、配列番号１または配列番号９のヌクレオチド位置番号付けを参照して７５９位の残基位置におけるヒスチジンの変異であってもよく、場合によってはヒスチジンからアラニンへの変異（Ｈ７５９Ａ）であり得る。低減した一本鎖ＤＮＡ切断活性を有する例示的なＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）（配列番号１４８）を含み得るが、これに限定はされない。一部の実施形態において、本発明で有用なＨ７５９Ａ変異を有するＣａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、配列番号１４８のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含み得る。一部の実施形態において、Ｈ７５９Ａ変異を有するＣａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ＬｂＣａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質であってもよく、場合によってはＬｂＣａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、配列番号１４８のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を含む。

【０１２１】

一部の実施形態において、本発明で有用なＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはドメインは、そのヌクレアーゼ活性部位（例えば、ｄＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはドメインのＲｕｖＣ、例えば、Ｃａｓ１２ａヌクレアーゼドメインのＲｕｖＣ部位）に変異を含んでいてもよい。ヌクレアーゼ活性部位に変異を有し、それゆえヌクレアーゼ活性を持たなくなったＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼは、一般に「不活化した」または「死んだ」、例えば、ｄＣａｓ、ｄＣａｓ１２ａと呼ばれる。一部の実施形態において、そのヌクレアーゼ活性部位に変異を有するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼドメインまたはポリペプチドは、変異のない同じＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼと比較して、損なわれた活性または低減した活性を有し得る。一部の実施形態において、不活化されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ニッカーゼ（第１鎖ニッカーゼおよび／または第２鎖ニッカーゼ）として機能し得る。

【０１２２】

一部の実施形態において、本発明で有用なＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはドメインは、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＤＮＡ結合親和性を低減させる１つまたは複数のアミノ酸残基の修飾を含み得る。一部の実施形態において、修飾は、アミノ酸置換であってもよい。一部の実施形態において、ＤＮＡ骨格と相互作用する正に荷電した残基は変異していてもよく、場合によってはＤＮＡ骨格と相互作用する正に荷電した残基は、アラニンに変異していてもよい（例えば、アラニンで置換されている）。Ｃａｓ１２ａエフェクタータンパク質におけるアラニンの正に荷電した残基の置換は、配列番号１または配列番号１４８のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｋ１６７Ａ、Ｋ２７２Ａ、および／またはＫ３４９Ａのアミノ酸置換を含み得るが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、配列番号１４８のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｋ１６７Ａ、Ｋ２７２Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ１６７Ａ＋Ｋ２７２Ａ、Ｋ１６７Ａ＋Ｋ３４９Ａ、Ｋ２７２Ａ＋Ｋ３４９Ａ、またはＫ１６７Ａ＋Ｋ２７２Ａ＋Ｋ３４９Ａのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質であり、場合によってはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質はＬｂＣａｓ１２ａである。

【０１２３】

一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、ここで、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質は、逆転写酵素に融合したＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む。一部の実施形態において、逆転写酵素は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドの Ｃ末端に融合され得る。一部の実施形態において、逆転写酵素は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドの Ｎ末端に融合され得る。

【０１２４】

一部の実施形態において、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｖ型

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、ここで、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質は、ニッキング酵素（例えば、Ｆｏｋ１、ＢＦｉ１、例えば、操作されたＦｏｋ１またはＢＦｉＩ）に融合されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含み、場合によってはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインは、ニッキング酵素に融合された不活化Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓドメインであり得る。

【０１２５】

一部の実施形態において、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質は、逆転写酵素に融合したＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む。一部の実施形態において、逆転写酵素は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドの Ｃ末端に融合され得る。一部の実施形態において、逆転写酵素は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドの Ｎ末端に融合され得る。一部の実施形態において、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、ここで、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質は、ニッキング酵素に融合されたＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含み（例えば、Ｆｏｋ１、ＢＦｉ１、例えば、操作されたＦｏｋ１またはＢＦｉＩ）、場合によってはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインは、ニッキング酵素に融合された不活化ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓドメインであり得る。

【０１２６】

一部の実施形態において、本発明で有用な逆転写酵素は、野生型逆転写酵素であり得る。一部の実施形態において、本発明で有用な逆転写酵素は、合成逆転写酵素であってもよく、例えば、Ｈｅｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４７（７）３６１９－３６３０（２０１９））を参照されたい。例示的な逆転写酵素ポリペプチドは、配列番号５３または配列番号１７２のアミノ酸配列に対して、実質的な同一性（例えば、少なくとも約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、または１００％の同一性）を有するものが含まれるが、これらに限定はされない。

【０１２７】

一部の実施形態において、逆転写酵素の活性は、Ｖ型またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドとの関連で最適な活性を提供するために（Ｖ型またはＩＩ型）遺伝子編集活性について修飾され得る（例えば、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドと結合させたときの活性が、修飾されていない参照用の逆転写酵素と比較して、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３４５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％増加）。そのような変異は、ＲＴの開始、処理能力、酵素の反応速度、温度感受性、および／またはエラー率に影響する、またはそれらを改善するものを含む。

【０１２８】

一部の実施形態において、本発明で有用な逆転写酵素は、逆転写酵素の転写機能を向上させるために改変されていてもよい。逆転写酵素の転写機能は、逆転写酵素の処理能力を向上させる、例えば、鋳型への単一の結合イベントの間に（例えば、それが鋳型から落ちる前に）より多くのＤＮＡ塩基を重合する逆転写酵素の能力を増大させる（例えば、修飾されていない参照用の逆転写酵素と比較して、処理能力を約５、１０、１５、２０、２５、３０、３４５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％増大させる）ことによって、改善され得る。

【０１２９】

一部の実施形態において、逆転写酵素の転写機能は、逆転写酵素の鋳型親和性を増加させる（例えば、修飾されていない参照用の逆転写酵素と比較して、鋳型親和性を約５、１０、１５、２０、２５、３０、３４５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％増大させる）ことによって改善され得る。

【０１３０】

一部の実施形態において、逆転写酵素の転写機能は、所望の温度での性能の改善のために逆転写酵素の熱安定性を向上させる（例えば、修飾されていない参照用の逆転写酵素と比較して、熱安定性を約５、１０、１５、２０、２５、３０、３４５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％高める）ことによって、改善され得る。一部の実施形態において、改善された熱安定性は、約２０℃から４２℃（例えば、約２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、または４２℃、およびその中の任意の値または範囲）の温度におけるものである。一部の実施形態において、改善された熱安定性を有する逆転写酵素は、配列番号１７２のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｍ－ＭｕＬＶ三重変異体Ｄ２００Ｎ＋Ｌ６０３Ｗ＋Ｔ３３０ＰまたはＭ－ＭｕＬＶ五重変異体（５Ｍ）Ｄ２００Ｎ＋Ｌ６０３Ｗ＋Ｔ３３０Ｐ＋Ｔ３０６Ｋ＋Ｗ３１３Ｆを含み得るが、これらに限定はされない（例えば、配列番号５３）。例えば、Ｂａｒａｎａｕｓｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．２５，６５７－６６８（２０１２））；Ａｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ　５７６：１４９－１５７（２０１９））を参照。逆転写酵素における追加のアミノ酸修飾は、配列番号１７２のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｗ３８８Ｒ、Ｅ６０７Ｋ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｆ１５５Ｙ、Ｈ６３８Ｇ、Ｑ２２１Ｒ、Ｖ２２３Ｍおよび／またはＤ５２４Ｎのアミノ酸置換を含み得る。

【０１３１】

一部の実施形態において、本発明で有用な逆転写酵素は、配列番号１７２のアミノ酸位置番号付けを参照して、（１）Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｗ３８８Ｒ、およびＥ６０７Ｋ、（２）Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｗ３８８Ｒ、およびＥ６０７Ｋ、（３）５Ｍ（Ｔ３５５Ａ／Ｑ３５７Ｍ／Ｋ３５８Ｒ／Ａ３５９Ｇ／Ｓ３６０Ａ）、Ｆ１５５Ｙ、およびＨ６３８Ｇ、（４）５Ｍ（Ｔ３５５Ａ／Ｑ３５７Ｍ／Ｋ３５８Ｒ／Ａ３５９Ｇ／Ｓ３６０Ａ）、Ｑ２２１Ｒ、およびＶ２２３Ｍ；または（５）５Ｍ　Ｔ３５５Ａ／Ｑ３５７Ｍ／Ｋ３５８Ｒ／Ａ３５９Ｇ／Ｓ３６０Ａ）およびＤ５２４Ｎのアミノ酸置換の組合せを含み得るが、これらに限定はされない。

【０１３２】

本発明の一部の実施形態において、逆転写酵素は、１つまたは複数の一本鎖ＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）に融合され得る。本発明で有用なＲＢＤは、配列番号３７～５２（配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４１、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、および／または配列番号５２）を含み得るが、これらに限定はされず、それによって逆転写酵素の熱安定性、処理能力および鋳型親和性を改善する。

【０１３３】

本発明のポリペプチド／タンパク質／ドメイン（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、例えば、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質）、逆転写酵素、５’フラップエンドヌクレアーゼ、および／または５’－３’エキソヌクレアーゼ）は、１つまたは複数のポリヌクレオチドによってコードされてもよく、場合によっては１つまたは複数のプロモーターおよび／または他の調節配列（例えば、ターミネーター、オペロン、および／またはエンハンサーなど）に作動可能に連結され得る。一部の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、１つまたは複数の発現カセット

および／またはベクターに含まれていてもよい。一部の実施形態において、少なくとも１つの調節配列は、例えば、プロモーター、オペロン、ターミネーター、またはエンハンサーであり得る。一部の実施形態において、少なくとも１つの調節配列は、プロモーターであり得る。一部の実施形態において、調節配列は、イントロンであってもよい。一部の実施形態において、少なくとも１つの調節配列は、例えば、イントロンと作動可能に結合されたプロモーター、またはイントロンを含むプロモーター領域であり得る。一部の実施形態において、少なくとも１つの調節配列は、例えば、ユビキチンプロモーターとその関連イントロン（例えば、タルウマゴヤシ（Ｍｅｄｉｃａｇｏ ｔｒｕｎｃａｔｕｌａ）および／またはトウモロコシとそれらの関連イントロン）であり得る（例えば、イントロンを含むＺｍＵｂｉ１；イントロンを含むＭｔＵｂ２、例えば、配列番号２１または２２）。

【０１３４】

一部の実施形態において、本発明は、イントロンを含むか、またはイントロンに結合した１つまたは複数のプロモーター領域と作動可能に結合したＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質もしくはドメインまたはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質もしくはドメインをコードするポリヌクレオチド、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質もしくはドメインをコードするポリヌクレオチド、逆転写酵素ポリペプチドもしくはドメインをコードするポリヌクレオチド、５’－３’エキソヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメインをコードするポリヌクレオチド、ならびに／またはフラップエンドヌクレアーゼポリペプチドもしくはドメインをコードするポリヌクレオチドを提供し、場合によってはプロモーター領域はユビキチンプロモーターとイントロン（例えば、ウマゴヤシ（Ｍｅｄｉｃａｇｏ）またはトウモロコシのユビキチンプロモーターとイントロン、例えば、配列番号２１または２２）であり得る。

【０１３５】

一部の実施形態において、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび／または逆転写酵素をコードするポリヌクレオチドは、同一または別個の発現カセット中に含まれていてもよく、場合によってはＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチドと逆転写酵素をコードするポリヌクレオチドが、同じ発現カセット中に含まれている場合、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび逆転写酵素をコードするポリヌクレオチドは、単一のプロモーターに、または任意の組合せで２以上の別個のプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチドは、発現カセット中に含まれていてもよく、ここで、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されていてもよい。

【０１３６】

一部の実施形態において、拡張ガイド核酸および／またはガイド核酸は、発現カセット中に含まれていてもよく、場合によっては、発現カセットは、ベクター中に含まれている。一部の実施形態において、拡張ガイド核酸を含む発現カセットおよび／もしくはベクターは、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび／または逆転写酵素をコードするポリヌクレオチドを含むものと同一または異なる発現カセットおよび／もしくはベクターであってもよい。一部の実施形態において、ガイド核酸を含む発現カセットおよび／もしくはベクターは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットおよび／もしくはベクターと同一であっても、異なるものであってもよい。

【０１３７】

一部の実施形態において、５’フラップエンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドおよび／または５’－３’エキソヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、同一または異なる発現カセットであり得る１つまたは複数の発現カセットに含まれていてもよい。一部の実施形態において、５’フラップエンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレ

オチドおよび／または５’－３’エキソヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットは、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド、および／または逆転写酵素をコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットと同じであっても、異なるものであってもよい。

【０１３８】

本発明の一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質）、逆転写酵素、フラップエンドヌクレアーゼ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、およびそれを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、ならびにポリヌクレオチドを含む核酸構造体、発現カセットおよび／もしくはベクターは、生物（例えば、動物（例えば、哺乳動物、昆虫、魚など）、植物（例えば、双子葉植物、単子葉植物）、細菌、古細菌、ウイルスなど）における発現のためにコドン最適化されていてもよい。一部の実施形態において、ポリヌクレオチド、発現カセット、および／またはベクターは、植物、場合によっては双子葉植物または単子葉植物における発現のためにコドン最適化され得る。本発明が有用であり得る例示的な哺乳動物は、霊長類（ヒトおよび非ヒト（例えば、チンパンジー、ヒヒ、サル、ゴリラその他））、ネコ、イヌ、フェレット、スナネズミ、ハムスター、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ロバ、またはヒツジを含むが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、ポリヌクレオチド、発現カセット、および／またはベクターは、接合菌類（Ｚｙｇｏｍｙｃｏｔａ）、子嚢菌（Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ）、担子菌（Ｂａｓｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ）および不完全菌（Ｄｅｕｔｅｒｏｍｙｃｏｔａ）（不完全菌類（ｆｕｎｇｉ　ｉｍｐｅｒｆｅｃｔｉ））を含むがこれらに限定されない真菌における発現にコドン最適化されていてもよく、場合によっては、真菌は子嚢菌、場合によっては酵母（例えば、出芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））であり得る。

【０１３９】

一部の実施形態において、生物における発現に最適化された本発明のポリヌクレオチド、核酸構造体、発現カセットまたはベクターは、同じものをコードするが、植物における発現にコドン最適化されていない核酸構造体、発現カセットまたはベクターに対して、約７０％から１００％同一（例えば、約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％または１００％）であり得る。

【０１４０】

一部の実施形態において、本発明の方法を実施するために、ポリヌクレオチド、核酸構造体、発現カセットおよびベクターが提供され得る。したがって、一部の実施形態においては、５’から３’の向きに（ａ）プロモーター配列をコードするポリヌクレオチド、（ｂ）生物における発現のためにコドン最適化されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）、ｄＣａｓ１２ａなど）またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９、ｄＣａｓ９など）、（ｃ）リンカー配列；ならびに（ｄ）生物における発現のためにコドン最適化された逆転写酵素をコードするポリヌクレオチドを含む、生物における発現のためにコドン最適化された発現カセットが提供される。一部の実施形態において、生物は、動物、植物、真菌、古細菌、または細菌である。一部の実施形態において、生物は植物であり、そしてＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、植物における発現のためにコドン最適化されており、プロモーター配列は、植物特異的プロモーター配列（例えば、ＺｍＵｂｉ１、ＭｔＵｂ２、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩ））である。

【０１４１】

一部の実施形態において、本発明の方法を実施するために、ポリヌクレオチド、核酸構造体、発現カセットおよびベクターが提供され得る。したがって、一部の実施形態におい

ては、５’から３’の向きに（ａ）植物特異的プロモーター配列をコードするポリヌクレオチド（例えば、ＺｍＵｂｉ１、ＭｔＵｂ２、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩ））、（ｂ）ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）、ｄＣａｓ１２ａなど）をコードする植物コドン最適化ポリヌクレオチド、（ｃ）リンカー配列；ならびに（ｄ）逆転写酵素をコードする植物コドン最適化ポリヌクレオチドを含む、植物における発現のためにコドン最適化された発現カセットが提供される。

【０１４２】

一部の実施形態において、本発明のポリペプチドは、リンカーを介して互いに連結された１つまたは複数のポリペプチドを含む融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、リンカーは、アミノ酸またはペプチドリンカーであり得る。一部の実施形態において、ペプチドリンカーは、本明細書中に記載されるように、長さが約２から約１００アミノ酸（残基）であってもよい。一部の実施形態において、ペプチドリンカーは、例えば、ＧＳリンカーであり得る。

【０１４３】

一部の実施形態において、本発明は、（ａ）植物特異的プロモーター配列（例えば、ＺｍＵｂｉ１、ＭｔＵｂ２）をコードするポリヌクレオチド、および（ｂ）拡張ガイド核酸配列を含む、植物における発現のためにコドン最適化された発現カセットであって、拡張ガイド核酸は、その３’末端にプライマー結合部位および標的核酸に組み込まれる編集部（例えば、逆転写酵素鋳型中の編集部）（例えば、５’－３’－ｃｒＲＮＡ－ＲＴＴ－ＰＢＳ）（例えば、タグ核酸；例えば、ｔａｇＲＮＡ）を含む拡張部分を含み、場合によっては拡張ガイド核酸が発現カセット中に含まれており、場合によっては拡張ガイド核酸がＰｏｌ　ＩＩプロモーターに作動可能に連結されている、発現カセットを提供する。一部の実施形態において、ガイド核酸の拡張部分がｃｒＲＮＡの５’末端でＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡに付着されている場合、拡張部分は、その５’末端にプライマー結合部位を含み、３’末端に標的核酸に組み込まれる編集部（例えば、逆転写酵素鋳型）を含む（５’－３’－ＰＢＳ－ＲＴＴ－ｃｒＲＮＡ）。

【０１４４】

一部の実施形態において、本発明の発現カセットは、双子葉植物での発現または単子葉植物での発現のためにコドン最適化されていてもよい。一部の実施形態において、本発明の発現カセットは、植物または植物細胞中の標的核酸を修飾する方法において使用されてもよく、本方法は、本発明の１つまたは複数の発現カセットを植物または植物細胞に導入することを含み、それによって植物または植物細胞において標的核酸を修飾し、修飾された標的核酸を含む植物または植物細胞を生成する。一部の実施形態において、本方法は、修飾された標的核酸を含む植物を生成するために、修飾された標的核酸を含む植物細胞を再生させることをさらに含んでいてもよい。

【０１４５】

一部の実施形態において、本発明の発現カセットは、動物、例えば、哺乳動物における発現のためにコドン最適化されていてもよい。一部の実施形態において、本発明の発現カセットは、動物細胞（例えば、哺乳動物細胞）中の標的核酸を修飾する方法において使用されてもよく、本方法は、本発明の１つまたは複数の発現カセットを動物細胞に導入することを含み、それによって動物細胞において標的核酸を修飾し、修飾された標的核酸を含む動物細胞を生成する。

【０１４６】

本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９ポリペプチドまたはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９ドメイン（例えば、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓｅエフェクタータンパク質）は、任意の既知または後に同定されるＣａｓ９ヌクレアーゼであり得る。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９ポリペプチドは、例えば、ストレプトコッカス属（例えば、化膿レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ））由来のＣａｓ９ポリペプチド（例えば、ｓｐＣａｓ９）、ラクト

バチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐｐ．）、ビフィドバクテリウム属（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐｐ．）、カンドレリア属（Ｋａｎｄｌｅｒｉａ　ｓｐｐ．）、ロイコノストック属（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ　ｓｐｐ．）、オエノコッカス属（Ｏｅｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐｐ．）、ペディオコッカス属（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐｐ．）、ワイセラ属（Ｗｅｉｓｓｅｌｌａ　ｓｐｐ．）、および／またはオルセネラ属（Ｏｌｓｅｎｅｌｌａ　ｓｐｐ．）に由来するＣａｓ９ポリペプチドであり得る。

【０１４７】

Ｃａｓ１２ａは、Ｖ型Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　Ｓｈｏｒｔ　Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　Ｒｅｐｅａｔｓ（ＣＲＩＳＰＲ）－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはドメインである。Ｃａｓ１２ａは、より周知のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９エフェクタータンパク質とは、いくつかの点において異なる。例えば、Ｃａｓ９は、そのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ）結合部位（プロトスペーサー、標的核酸、標的ＤＮＡ）の３’側にあるＧリッチプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）（３’－ＮＧＧ）を認識する一方、Ｃａｓ１２ａは、標的核酸の５’側に位置決めされているＴリッチＰＡＭ（５’－ＴＴＮ、５’－ＴＴＴＮ）を認識する。実際、Ｃａｓ９およびＣａｓ１２ａがそれらのガイドＲＮＡに結合する向きは、それらのＮ末端およびＣ末端に関して、大半が逆転している。さらに、Ｃａｓ１２ａエフェクタータンパク質は、天然のＣａｓ９系において見出されるデュアルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ））ではなくシングルガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲアレイ、ｃｒＲＮＡ）を用い、そしてＣａｓ１２ａは、自己のｇＲＮＡをプロセシングする。加えて、Ｃａｓ１２ａのヌクレアーゼ活性は、Ｃａｓ９のヌクレアーゼ活性によって生成される平滑末端の代わりに、スタガーＤＮＡ二本鎖切断を生成し、そしてＣａｓ１２ａは、双方のＤＮＡ鎖を切断するのに、単一のＲｕｖＣドメインをあてにするが、Ｃａｓ９は、切断にＨＮＨドメインおよびＲｕｖＣドメインを利用する。

【０１４８】

本発明に有用なＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ１２ａエフェクタータンパク質またはドメインは、知られているか、または後に同定されるあらゆるＣａｓ１２ａヌクレアーゼ（以前にＣｐｆ１として知られていた）であり得る（例えば、米国特許第９，７９０，４９０号（Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）配列の開示について、引用することにより本明細書の一部をなすものとする）参照）。用語「Ｃａｓ１２ａ」、「Ｃａｓ１２ａポリペプチド」、または「Ｃａｓ１２ａドメイン」は、Ｃａｓ１２ａのガイド核酸結合ドメイン、および／またはＣａｓ１２ａの活性のある、不活性である、もしくは部分的に活性のあるＤＮＡ切断ドメインを含む、Ｃａｓ１２ａまたはその断片を含むＲＮＡガイドエフェクタータンパク質を指す。一部の実施形態において、本発明に有用なＣａｓ１２ａは、変異をヌクレアーゼ活性部位（例えば、Ｃａｓ１２ａドメインのＲｕｖＣ部位）内に含んでもよい。ヌクレアーゼ活性部位に変異を有し、それゆえヌクレアーゼ活性を持たなくなったＣａｓ１２ａエフェクタータンパク質またはドメインは、一般に死んだ、または不活化したＣａｓ１２ａ（例えば、ｄＣａｓ１２ａ）と呼ばれる。

【０１４９】

一部の実施形態において、本発明に従う最適化または他の方法で修飾（例えば、不活化）され得るＣａｓ１２ａエフェクターポリペプチドは、配列番号１～２０（例えば、配列番号　１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０）のいずれか１つのアミノ酸配列、または配列番号１４８、１４９、１５０もしくは１５１、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含み得るが、これらに限定はされない。

【０１５０】

一部の実施形態において、本発明に従って最適化または他の方法で修飾（例えば、不活化）されていてもよいＣａｓ９エフェクターポリペプチドは、配列番号１０６または配列番号１０７のいずれか１つのアミノ酸配列、またはそれをコードするポリヌクレオチドを含み得るが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、本発明に従って最適化

または他の方法で修飾（例えば、不活化）されていてもよいＣａｓ９エフェクターポリペプチドは、配列番号１０８～１２２の核酸配列のいずれか１つによってコードされるアミノ酸配列を含み得る。

【０１５１】

本明細書中で用いられる「ガイド核酸」、「ガイドＲＮＡ」、「ｇＲＮＡ」、「ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ／ＤＮＡ」「ｃｒＲＮＡ」または「ｃｒＤＮＡ」は、標的ＤＮＡ（例えば、プロトスペーサー）に相補的である（そしてハイブリダイズする）少なくとも１つのスペーサー配列、および特定のＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳエフェクタータンパク質に対応する少なくとも１つの反復配列を含む核酸を意味する（例えば、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓエフェクタータンパク質の場合、反復またはその断片もしくは一部は、Ｖ型Ｃａｓ１２ａ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に由来し；ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓエフェクタータンパク質の場合、反復またはその断片もしくは一部は、ＩＩ型Ｃａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に由来する）。したがって、本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の反復は、例えば、Ｃａｓ９、Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１とも呼ばれる）、Ｃａｓ１２ｂ、Ｃａｓ１２ｃ、Ｃａｓ１２ｄ、Ｃａｓ１２ｅ、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、Ｃａｓ１３ｄ、Ｃａｓｌ、ＣａｓｌＢ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ３’、Ｃａｓ３”、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（ＣｓｎｌおよびＣｓｘ１２とも呼ばれる）、Ｃａｓ１０、Ｃｓｙｌ、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅｌ、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃｌ、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒｌ、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂｌ、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘｌ７、Ｃｓｘｌ４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘｌ、Ｃｓｘｌ５、Ｃｓｆｌ、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４（ｄｉｎＧ）、および／またはＣｓｆ５のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、またはその断片に対応してもよく、ここで、反復配列は、スペーサー配列の５’末端および／または３’末端に連結され得る。本発明のガイド核酸の設計は、Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に基づくものであり得る。一部の実施形態において、本発明のガイド核酸の設計は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に基づくものである。一部の実施形態において、本発明のガイド核酸の設計は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に基づくものである。

【０１５２】

一部の実施形態において、ガイド核酸（例えば、ｃｒＲＮＡ、例えば、Ｃａｓ１２ａ　ｃｒＲＮＡ、Ｃａｓ１２ｂ　ｃｒＲＮＡ、Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡなど）は、５’から３の向きに、反復配列（全長またはその一部（「ハンドル」）；例えば、シュードノット様構造）およびスペーサー配列を含み得る。一部の実施形態において、拡張ガイド核酸（例えば、ｔａｇＲＮＡ、例えば、Ｃａｓ１２ａ拡張ガイド核酸、Ｃａｓ１２ｂ拡張ガイド核酸、Ｃａｓ９拡張ガイド核酸など）は、５’から３’の向きに、反復配列（全長またはその一部（「ハンドル」）；例えば、シュードノット様構造）、スペーサー配列、さらにプライマー結合部位と逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）（ＲＴＴ）を含む３’もしくは５’拡張部分（例えば、ｔａｇＲＮＡ拡張部）を含み得る。

【０１５３】

一部の実施形態において、ガイド核酸は、複数の反復配列－スペーサー配列（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個、またはそれを超える反復－スペーサー配列）を含んでもよい（例えば、反復－スペーサー－反復、例えば、反復－スペーサー－反復－スペーサー－反復－スペーサー－反復－スペーサー－反復－スペーサー等）。本発明のガイド核酸は、合成の、人工の、天然に見出されないものである。ガイド核酸はかなり長くてもよく、（ＭＳ２動員戦略におけるように）アプタマーまたはスペーサーにぶら下がった他のＲＮＡ構造として使用されてもよい。一部の実施形態において、本明細書中に記載されるように、ガイド核酸は、編集のための鋳型およびプライマー結合部位を含み得る。一部の実施形態において、ガイド核酸は、編集鋳型（逆転写酵素鋳型）に相補的な領域または配列をその５’末端または３’末端に含んでいてもよく、それによって編集鋳型を標的核酸（すなわち、拡張ガイド核酸）へと動員する。一部の実施形態において、ガイド核酸

は、その５’末端または３’末端に、標的核酸上のプライマーに相補的な領域または配列（プライマー結合部位）を含んでいてもよく、それによってプライマー結合部位を標的核酸（すなわち、拡張ガイド核酸）へと動員する。

【０１５４】

本明細書中で用いられる「反復配列」とは、例えば、野生型ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ遺伝子座（例えば、Ｃａｓ９遺伝子座、Ｃａｓ１２ａ遺伝子座、Ｃ２ｃ１遺伝子座など）の任意の反復配列、または本発明の核酸構造体によってコードされるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼと共に機能する合成ｃｒＲＮＡの反復配列を指す。本発明に有用な反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ遺伝子座（例えば、Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、Ｖ型またはＶＩ型）の、知られているか、もしくは後に同定されるあらゆる反復配列であり得、またはＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、ＶまたはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系において機能するように設計された合成反復であり得る。したがって、一部の実施形態において、反復配列は、野生型Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座、ＩＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座および／またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座からの反復配列と同一または実質的に同一であり得る。一部の実施形態において、本発明で有用な反復配列は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座の既知または後に同定される反復配列であるか、またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系で機能するように設計された合成反復であり得る。反復配列は、ヘアピン構造および／またはステムループ構造を含んでもよい。一部の実施形態において、反復配列は、その５’末端に、シュードノット様構造（すなわち「ハンドル」）を形成し得る。ゆえに、一部の実施形態において、反復配列は、野生型Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座または野生型ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座由来の反復配列と同一または実質的に同一であり得る。野生型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座からの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲｄｂを通じて提供されるＣＲＩＳＰＲｆｉｎｄｅｒを使用するなど、確立されたアルゴリズムを通じて決定され得る（Ｇｒｉｓｓａ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３５（Ｗｅｂ Ｓｅｒｖｅｒ ｉｓｓｕｅ）：Ｗ５２－７またはＢＭＣ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ８：１７２（２００７）（ｄｏｉ：１０．１１８６／１４７１－２１０５－８－１７２）を参照）。一部の実施形態において、反復配列またはその一部は、その３’末端にてスペーサー配列の５’末端に連結されており、それによって、反復－スペーサー配列（例えば、ガイドＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ）を形成する。

【０１５５】

一部の実施形態において、反復配列は、特定の反復、および反復を含むガイドＲＮＡがプロセシングされるか、プロセシングされないかに応じて、少なくとも１０ヌクレオチド（例えば、約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０～１００個、もしくはそれを超えるヌクレオチド、またはその中のあらゆる範囲もしくは値、例えば、約）を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる。一部の実施形態において、反復配列は、約１０～約２０、約１０～約３０、約１０～約４５、約１０～約５０、約１５～約３０、約１５～約４０、約１５～約４５、約１５～約５０、約２０～約３０、約２０～約４０、約２０～約５０、約３０～約４０、約４０～約８０、約５０～約１００個、またはそれを超えるヌクレオチドを含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる。

【０１５６】

スペーサー配列の５’末端に連結された反復配列は、反復配列の一部（例えば、野生型反復配列の５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５個、またはそれを超える連続ヌクレオチド）を含み得る。一部の実施形態において、スペーサー配列の５’末端に連結された反復配列の一部は、約５～

約１０連続ヌクレオチド（例えば、約５、６、７、８、９、１０ヌクレオチド）長であり得、そして野生型ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ反復ヌクレオチド配列の同じ領域（例えば５’末端）に対して少なくとも９０％（例えば、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれを超える）の同一性を有する。一部の実施形態において、反復配列の一部は、その５’末端にシュードノット様の構造（例えば、「ハンドル」）を含んでいてもよい。

【０１５７】

本明細書中で用いられる「スペーサー配列」は、標的核酸（例えば標的ＤＮＡ）と相補的なヌクレオチド配列（例えばプロトスペーサー）である。スペーサー配列は、標的核酸と完全に相補的であり得るか、または実質的に相補的であり得る（例えば、少なくとも約７０％（例えば、約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％またはそれを超える）相補的である）。ゆえに、一部の実施形態において、スペーサー配列は、標的核酸と比較して、１、２、３、４、または５つのミスマッチを有し得、当該ミスマッチは、連続していてもよいし、非連続であってもよい。一部の実施形態において、スペーサー配列は、標的核酸に対して７０％の相補性を有し得る。一部の実施形態において、スペーサーヌクレオチド配列は、標的核酸に対して８０％の相補性を有し得る。さらに他の実施形態において、スペーサーヌクレオチド配列は、標的核酸（プロトスペーサー）に対して８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％またはそれを超える相補性を有し得る。一部の実施形態において、スペーサー配列は、標的核酸と１００％相補的である。一部の実施形態において、スペーサー配列は、長さが約１５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド（例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、もしくは３０ヌクレオチド、またはその中のあらゆる範囲もしくは値）であり得る。ゆえに、一部の実施形態において、スペーサー配列は、少なくとも約１５ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド長である標的核酸（例えばプロトスペーサー）の領域にわたって完全な相補性または実質的な相補性を有し得る。一部の実施形態において、スペーサーは、約２０ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、スペーサーは、約２３ヌクレオチド長である。

【０１５８】

一部の実施形態において、ガイドＲＮＡのスペーサー配列の５’領域は、標的ＤＮＡと同一であり得るが、スペーサーの３’領域は、標的ＤＮＡ（例えば、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ）と実質的に相補的であってもよく、または、ガイドＲＮＡのスペーサー配列の３’領域は、標的ＤＮＡと同一であり得るが、スペーサーの５’領域は、標的ＤＮＡ（例えば、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ）と実質的に相補的であってもよく、したがって、標的ＤＮＡに対するスペーサー配列の全体的な相補性は１００％未満であり得る。ゆえに、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のガイドにおいて、例えば、２０ヌクレオチドのスペーサー配列の５’領域（すなわち、シード領域）内の例えば、最初の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０のヌクレオチドは、標的ＤＮＡに１００％相補的であり得る一方、スペーサー配列の３’領域内の残りのヌクレオチドは、標的ＤＮＡと実質的に相補的（例えば、少なくとも約７０％相補的）である。一部の実施形態において、スペーサー配列の５’末端の最初の１～８ヌクレオチド（例えば、最初の１、２、３、４、５、６、７、８ヌクレオチド、およびその中のあらゆる範囲）は、標的ＤＮＡと１００％相補的であり得る一方、スペーサー配列の３’領域内の残りのヌクレオチドは、標的ＤＮＡと実質的に相補的である（例えば、少なくとも約５０％（例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５

％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％またはそれを超える）相補的である）。

【０１５９】

更なる例として、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のガイドにおいて、例えば、２０ヌクレオチドのスペーサー配列の３’領域（すなわち、シード領域）の最初の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０ヌクレオチドは、標的ＤＮＡに１００％相補的であり得る一方、スペーサー配列の５’領域の残りのヌクレオチドは、標的ＤＮＡに実質的に相補的（例えば、少なくとも約７０％相補的）である。一部の実施形態において、スペーサー配列の３’末端の最初の１から１０ヌクレオチド（例えば、最初の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０ヌクレオチド、およびその中の任意の範囲）は、標的ＤＮＡに対して１００％相補的であり得る一方、スペーサー配列の５’領域の残りのヌクレオチドは、標的ＤＮＡに対して実質的に相補的（例えば、少なくとも約５０％相補的（例えば、少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％以上、またはその中の任意の範囲もしくは値））である。

【０１６０】

一部の実施形態において、スペーサーのシード領域は、長さが約８から約１０ヌクレオチド、長さが約５から約６ヌクレオチド、または長さが約６ヌクレオチドであり得る。

【０１６１】

一部の実施形態において、本発明の拡張ガイド核酸は、拡張ガイド核酸、第１の拡張ガイド核酸および／または第２の拡張ガイド核酸であり得る。一部の実施形態において、本発明で有用な拡張ガイド核酸は、（ａ）ＣＲＩＳＰＲ核酸（例えば、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ｃｒＲＮＡ、ｃｒＤＮＡ）および／またはＣＲＩＳＰＲ核酸およびｔｒａｃｒ核酸；（ｂ）プライマー結合部位および逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）を含む拡張部分であって、ＲＴ鋳型が本明細書中に記載されるように標的核酸に組み込まれる修飾をコードする（例えば、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置に相対的な位置で、ＲＴ鋳型内の任意の位置に位置する編集部、場合によっては－１位のヌクレオチド位置から１９位のヌクレオチド位置、１０位のヌクレオチド位置から１７位のヌクレオチド位置、または１２位のヌクレオチド位置から１５位のヌクレオチド位置に位置する編集部をコードする）、拡張部分を含み得る。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ核酸は、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸であってもよく、および／またはｔｒａｃｒ核酸は、適切なＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸に対応する任意のｔｒａｃｒであり得る。拡張ガイド核酸は、標的化対立遺伝子ガイド核酸、標的化対立遺伝子ガイドＤＮＡ、標的化対立遺伝子ガイドＲＮＡ（ｔａｇＲＮＡ））と呼ばれることもある。一部の実施形態において、本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ核酸は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ核酸であり得る。一部の実施形態において、本発明で有用なｔｒａｃｒ核酸は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ　ｔｒａｃｒ核酸であり得る。一部の実施形態において、本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ核酸は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸であり得る。一部の実施形態において、本発明で有用なｔｒａｃｒ核酸は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸ｔｒａｃｒであり得る。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ核酸および／またはｔｒａｃｒ核酸は、例えば、Ｃａｓ９、Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１とも呼ばれる）、Ｃａｓ１２ｂ、Ｃａｓ１２ｃ、Ｃａｓ１２ｄ、Ｃａｓ１２ｅ、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、Ｃａｓ１３ｄ、Ｃａｓｌ、ＣａｓｌＢ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ３’、Ｃａｓ３”、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（ＣｓｎｌおよびＣｓｘ１２とも呼ばれる）、Ｃａｓ１０、Ｃｓｙｌ、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅｌ、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃｌ、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒｌ、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂｌ、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘｌ７、Ｃｓｘｌ４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘｌ、Ｃｓｘｌ５、Ｃｓｆ

ｌ、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４（ｄｉｎＧ）および／またはＣｓｆ５系に由来するものであり得る。

【０１６２】

一部の実施形態において、拡張ガイドの拡張部分は、５’から３’の向きにＲＴ鋳型およびプライマー結合部位を含み得る（拡張ガイドがＣＲＩＳＰＲ核酸の３’末端に連結されている場合）。一部の実施形態において、拡張ガイドの拡張部分は、５’から３’の向きにプライマー結合部位およびＲＴ鋳型（ＲＴＴ）を含み得る（拡張ガイドがＣＲＩＳＰＲ核酸の５’末端に連結されている場合）。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、約１ヌクレオチドから約１００ヌクレオチドの長さ（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上のヌクレオチド、およびその中の任意の範囲または値）、例えば、約３５ヌクレオチドから約１００ヌクレオチド、約３５ヌクレオチドから約８０ヌクレオチド、約３５ヌクレオチドから約７５ヌクレオチド、約４０ヌクレオチドから約７５ヌクレオチド、約４５ヌクレオチドから約７５ヌクレオチド、約４５ヌクレオチドから約６０ヌクレオチド、およびその中の任意の範囲または値の長さであり得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型の長さは、少なくとも３０ヌクレオチド、場合によっては約３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドから約４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、または８０ヌクレオチド、またはその中の任意の範囲または値の長さであり得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型の長さは、約８３６、４０、４４、４７、５０、５２、５５、６３、７２または７４ヌクレオチドであり得る。ＲＴＴの長さ内に編集部が含まれる。編集部は、ＲＴＴ内のどこに配置されてもよく、編集部の位置は標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置と相対的に記述され得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、－１、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、２７、１８、または１９位のヌクレオチド位置に位置する編集部を含み得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置に対するＲＴ鋳型の４位のヌクレオチド位置から１７位のヌクレオチド位置（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、または１７位）に位置する編集部を含み得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置に対するＲＴ鋳型の１０位のヌクレオチド位置から１７位のヌクレオチド位置（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、または１７位）に位置する編集部を含み得る。一部の実施形態において、ＲＴ鋳型は、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置に対するＲＴ鋳型の１２位のヌクレオチド位置から１５位のヌクレオチド位置（例えば、１２、１３、１４、または１５位）に位置する編集部を含み得る。

【０１６３】

本明細書中で用いられる、拡張ガイド核酸（例えば、ｔａｇＲＮＡ）の拡張部分の「プライマー結合部位」（ＰＢＳ）は、標的核酸上の領域または「プライマー」に結合できる、すなわち標的核酸プライマーに相補的である連続するヌクレオチドの配列を指す。一例として、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、ＩＩ型またはＶ型、例えば、Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａ）が、ＤＮＡをニッキング／切断すると、切断されたＤＮＡの３’末端が拡張ガイド核酸のＰＢＳ部分のプライマーとして機能する。ＰＢＳは

、標的核酸の鎖の３’末端に相補的となるように設計されており、標的鎖または非標的鎖のいずれかに結合するように設計され得る。プライマー結合部位は、プライマーに対して完全に相補的であり得、または標的核酸上のプライマーに対して実質的に相補的（例えば、少なくとも７０％相補的（例えば、約７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％以上））であってもよい。一部の実施形態において、拡張部分のプライマー結合部位の長さは、約１ヌクレオチドから約１００ヌクレオチドの長さ（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上のヌクレオチド、あるいはその任意の値または範囲）、または約４ヌクレオチドから約８５ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約２０ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約２５ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約３０ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約４０ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約４５ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約４５ヌクレオチドから約７５ヌクレオチド、または約４５ヌクレオチドから約６０ヌクレオチド、またはそれらの任意の範囲または値であり得る。一部の実施形態において、ＰＢＳの長さは、少なくとも３０ヌクレオチド、場合によっては約３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチドから約４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、または８０ヌクレオチド、またはその中の任意の範囲または値の長さであり得る。一部の実施形態において、ＰＢＳの長さは、約８、１６、２４、３２、４０、４８、５６、６４、７２、または８０ヌクレオチドであり得る。

【０１６４】

一部の実施形態において、ＲＴＴは約３５ヌクレオチドから約７５ヌクレオチドの長さを有し、ＰＢＳは約３０ヌクレオチドから約８０ヌクレオチドの長さを有し、場合によっては、ＰＢＳは約８、１６、２４、３２、４０、４８、５６、６４、７２、または８０ヌクレオチドの長さを含んでいてもよく、また、ＲＴＴは約３６、４０、４４、４７、５０、５２、５５、６３、７２または７４ヌクレオチドの長さを含んでいてもよく、あるいはＲＴＴの長さおよび／またはＰＢＳの長さのその任意の組合せが含まれ得る。

【０１６５】

一部の実施形態において、拡張ガイド核酸（例えば、拡張ガイド核酸、第１の拡張ガイド核酸、第２の拡張ガイド核酸）は、構造化ＲＮＡモチーフを含んでいてもよく、場合によっては、構造化ＲＮＡモチーフは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置していてもよい。一部の実施形態において、構造化ＲＮＡモチーフは、ＡｓＣｐｆ１ＢＢ（配列番号１８９）、ボックスＢ（配列番号１９０）、シュードノット（デコイ）（配列番号９５、配列番号２０３）、シュードノット（ｔＥｖｏＰｒｅＱ１）（配列番号１９１）、ｆｍｐｋｎｏｔ（配列番号１９２）、ｍｐｋｎｏｔ（配列番号１９３）、ＭＳ２（配列番号１９４）、ＰＰ７（配列番号１９５）、ＳＬＢＰ（配列番号１９６）、ＴＡＲ（配列番号１９７）、および／またはＴｈｅｒｍｏＰｈ（配列番号１９８）を含み得るが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、構造化ＲＮＡモチーフは、シュードノットであり得、場合によってはシュードノットは拡張ガイド核酸の３’末端に位置する。シュードノットは、ヘアピンのループにあるＲＮＡの一本鎖領域と、ＲＮＡ鎖の他の部分にある一連の相補

的ヌクレオチドとの塩基対形成によってできるＲＮＡ構造モチーフである。一部の実施形態において、本発明で有用なシュードノットは、天然に存在するシュードノットまたは合成のシュードノットであり得る。本明細書中で用いられるシュードノットという用語は、ヘアピン、マルチループ、キッシングループ、同軸スタッキング、トリプレックス、シュードノット様構造、シュードノット化ヘアピンおよび／またはデコイシュードノット化ヘアピンまたは他のＲＮＡ構造モチーフを含むが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、シュードノットは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置し得る。一部の実施形態において、拡張ガイドが５’－３’ｃｒＲＮＡ－ＲＴＴ－ＰＢＳを含む場合、シュードノットはＲＴＴの５’またはＰＢＳの３’に位置し得る。一部の実施形態において、シュードノットは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置し得る。一部の実施形態において、拡張ガイドがｃｒＲＮＡの５’末端に拡張部（拡張された部分）を含む場合、シュードノットはＲＴＴの３’またはＰＢＳの５’に位置し得る。一部の実施形態において、拡張ガイドで有用なシュードノットは、ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＡＡＧＵＧＵＡＧＡＵ（配列番号１５８）の核酸配列を含むｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノット、ＴＴＧＡＣＧＣＧＧＴＴＣＴＡＴＣＴＡＧＴＴＡＣＧＣＧＴＴＡＡＡＣＣＡＡＣＵＡＧＡＡＡ（配列番号１９１）の核酸配列を含むＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノット、またはＴＡＡＧＴＣＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＧＡＧＧ（配列番号９５）の核酸配列および／またはＵＡＡＧＵＣＵＣＣＡＵＡＧＡＡＵＧＧＡＧＧ（配列番号２０３）を含むシュードノットを含み得るが、これらに限定はされない。本発明の拡張ガイド核酸は、発現カセット中に含まれていてもよく、場合によっては、発現カセットは、ベクター中に含まれている。

【０１６６】

一部の実施形態において、拡張ガイドの拡張部分は、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸の５’末端または３’末端のいずれか（例えば、５’から３’の向き：反復－スペーサー－拡張部分、または拡張部分－反復－スペーサー）、および／またはｔｒａｃｒ核酸の５’または３’末端に融合され得る。一部の実施形態において、拡張部分がｃｒＲＮＡの５’に位置している場合、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、自己処理ＲＮＡｓｅ活性を低減（または排除）するように修飾される。一部の実施形態において、自己処理ＲＮＡｓｅ活性を低減（または排除）するように修飾されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、拡張部分がｃｒＲＮＡの３’に位置する場合にも利用され得る。

【０１６７】

一部の実施形態において、拡張ガイド核酸の拡張部分は、リンカーを介して、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸および／またはＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＲＮＡに連結され得る。一部の実施形態において、リンカーは、長さが約１から約１００ヌクレオチド以上（例えば、長さが約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上のヌクレオチド、およびその任意の範囲（例えば、長さが約２から約４０、約２～約５０、約２～約６０、約４～約４０、約４～約５０、約４～約６０、約５～約４０、約５～約５０、約５～約６０、約９～約４０、約９～約５０、約９～約６０、約１０～約４０、約１０～約５０、約１０～約６０、約４０～約１００、約５０から約１００、または約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５ヌクレオチドから約２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、

６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上のヌクレオチド（例えば、長さが約１０５、１１０、１１５、１２０、１３０、１４０、１５０以上のヌクレオチド）であり得る。

【０１６８】

本明細書中で用いられる「標的核酸」、「標的ＤＮＡ」、「標的ヌクレオチド配列」、「標的領域」、または「ゲノム中の標的領域」は、本発明のガイドＲＮＡ中のスペーサー配列に対して完全に相補的（１００％相補的）または実質的に相補的（例えば、少なくとも７０％相補的（例えば、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上））である生物のゲノムの領域を指す（例えば、スペーサーは標的核酸の標的鎖に実質的に相補的である）。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に有用な標的領域は、生物のゲノム（例えば、植物ゲノム）内のＰＡＭ配列のすぐ３’（例えば、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系）またはすぐ５’（例えば、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系）に位置し得る。標的領域は、標的鎖上のＰＡＭ配列のすぐ隣に位置する少なくとも１５個の連続したヌクレオチド（例えば、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０ヌクレオチドなど）の任意の領域から選択され得る。

【０１６９】

「プロトスペーサー配列」とは、標的二本鎖ＤＮＡ、特に、ＣＲＩＳＰＲ反復－スペーサー配列（例えば、ガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲアレイ、ｃｒＲＮＡ）のスペーサー配列と完全または実質的に相補的である（そしてハイブリダイズする）標的核酸／標的ＤＮＡの一部（例えば、つまりゲノム（例えば、核ゲノム、プラスチドゲノム、ミトコンドリアゲノム）、またはプラスミド、ミニクロモソームなどのゲノム外配列中の標的領域）を指す。したがって、プロトスペーサー配列は、標的核酸の標的鎖に相補的である。一部の実施形態において、標的核酸は、第１の鎖と第２の鎖（二本鎖ＤＮＡ）を有し得る。一部の実施形態において、標的核酸に関して本明細書中で用いられる「第１の鎖」という用語は、標的鎖またはボトム鎖を指し得る。一部の実施形態において、標的核酸に関して用いられる用語「第２の鎖」は、第１の鎖（例えば、トップ鎖または非標的鎖）に相補的である鎖である。

【０１７０】

当技術分野で理解され、本明細書中で用いられる「標的鎖」は、スペーサーが相補的であり、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が動員される二本鎖ＤＮＡの鎖を指す一方、「非標的鎖」は二本鎖核酸における標的鎖とは反対の鎖を指す。本発明の一部の実施形態において、二本鎖核酸の非標的鎖は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が動員される鎖とは反対の鎖であり、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質によってニッキングされ、逆転写酵素により編集される。一部の実施形態において、二本鎖核酸の標的鎖は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が動員されるのと同じ鎖であり、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質によってニッキングされ、逆転写酵素により編集される。

【０１７１】

Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（例えばＣａｓ１２ａ）系およびＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（Ｃａｓ９）系の場合、プロトスペーサー配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）が隣に（例えば直ちに隣接して）位置する。ＩＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系については、ＰＡＭは、非標的鎖上の５’末端に、そして標的鎖の３’末端に位置決めされる（一例として、下記参照）。

【化１】

5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' RNA スペーサー (配列番号 54)
　　| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3'**AAAN**NNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' 標的鎖 (配列番号 55)
　| | | |
5'**TTTN**NNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' 非標的鎖 (配列番号 56)

【０１７２】

ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（例えば、Ｃａｓ９）系の場合、ＰＡＭは標的領域のすぐ３’に位置する。Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のＰＡＭは、標的鎖の５’に位置する。ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系用のＰＡＭは知られていない。Ｍａｋａｒｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　１３：７２２－７３６（２０１５））は、ＣＲＩＳＰＲ系のあらゆるクラス、タイプ、サブタイプの命名法を説明している。ガイド構造およびＰＡＭは、Ｒ．Ｂａｒｒａｎｇｏｕ（Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．１６：２４７（２０１５））によって記載されている。

【０１７３】

カノニカルＣａｓ１２ａ　ＰＡＭは、Ｔリッチである。一部の実施形態において、カノニカルＣａｓ１２ａ　ＰＡＭ配列は、５’－ＴＴＮ、５’－ＴＴＴＮ、または５’－ＴＴＴＶであってよい。一部の実施形態において、カノニカルなＣａｓ９（例えば、化膿レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ））のＰＡＭは、５’－ＮＧＧ－３’であり得る。一部の実施形態において、非カノニカルＰＡＭが用いられてもよいが、あまり有効でない可能性がある。

【０１７４】

更なるＰＡＭ配列が、確立されている実験的アプローチおよび計算論的アプローチにより、当業者によって決定されてもよい。ゆえに、例えば、実験的アプローチは、考えられる全てのヌクレオチド配列が隣に位置する配列を標的とすることと、例えば標的プラスミドＤＮＡの形質転換により、標的化を受けない配列メンバーを識別することとを含む（Ｅｓｖｅｌｔ　ｅｔ　ａｌ．２０１３．Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ１０：１１１６－１１２１、Ｊｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．２０１３．Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１：２３３－２３９）。一部の態様において、計算論的アプローチは、天然のスペーサーのＢＬＡＳＴ検索を実行して、バクテリオファージまたはプラスミド内の元の標的ＤＮＡ配列を同定することと、これらの配列をアラインして、標的配列に隣接する保存された配列を決定することとを含み得る（Ｂｒｉｎｅｒ　ａｎｄ　Ｂａｒｒａｎｇｏｕ．２０１４．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．８０：９９４－１００１、Ｍｏｊｉｃａ　ｅｔ　ａｌ．２００９．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ１５５：７３３－７４０）。

【０１７５】

一部の実施形態において、本発明は、標的核酸を第１の部位において、（ａ）（ｉ）第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；および（ｉｉ）第１の拡張ガイド核酸（例えば、第１の拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、第１の拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、第１の拡張ｃｒＲＮＡ、第１の拡張ｃｒＤＮＡ）；および（ｂ）（ｉ）第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、（ｉｉ）第１の逆転写酵素；および（ｉｉ）第１のガイド核酸と接触させることを含み、それによって標的核酸を修飾する、標的核酸を修飾する方法をさらに提供する。一部の実施形態において、本発明の方法は、標的核酸を、（ａ）第３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；および（ｂ）第２のガイド核酸と接触させることをさらに含んでもよく、ここで、第３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質によってニッキングされた第２の鎖上の第２の部位から約１０から約１２５塩基対（５’または３’）に位置する標的核酸の第１の鎖上の部位をニッキングし、それによってミスマッチ修復を改善する。一部の実施形態において、本発明の方法は、標的核酸を（ａ）第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、（ｂ）第２の逆転写酵素、および（ｃ）第２の拡張ガイド核酸（例えば、第２の拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、第２の拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、

第２の拡張ｃｒＲＮＡ、第２の拡張ｃｒＤＮＡ）に接触させることをさらに含んでもよく、ここで、第２の拡張ガイド核酸は、標的核酸の第１の鎖上の部位を標的化し（スペーサーが標的核酸の第１の鎖上の部位に実質的に相補的であり／結合し）、それによって標的核酸を修飾する。本発明で有用なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、第１、第２、第３、第４）は、任意の組合せで、本明細書中に記載の任意のＩ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質であり得る。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、Ｃａｓ９、Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１とも呼ばれる）、Ｃａｓ１２ｂ、Ｃａｓ１２ｃ、Ｃａｓ１２ｄ、Ｃａｓ１２ｅ、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、Ｃａｓ１３ｄ、Ｃａｓｌ、ＣａｓｌＢ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ３’、Ｃａｓ３”、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（ＣｓｎｌおよびＣｓｘ１２とも呼ばれる）、Ｃａｓ１０、Ｃｓｙｌ、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅｌ、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃｌ、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒｌ、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂｌ、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘｌ７、Ｃｓｘｌ４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘｌ、Ｃｓｘｌ５、Ｃｓｆｌ、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４（ｄｉｎＧ）および／またはＣｓｆ５であり得る。

【０１７６】

一部の実施形態において、第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質で有用な拡張ガイド核酸は、（ａ）ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ｃｒＲＮＡ、ｃｒＤＮＡ）；ならびに（ｂ）プライマー結合部位および逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）を含む拡張部分であって、ＲＴ鋳型が本明細書中に記載されるように標的核酸に組み込まれる修飾をコードする（例えば、標的核酸のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の位置に相対的な位置で、ＲＴ鋳型内の任意の位置に位置する編集部、場合によっては－１位のヌクレオチド位置から１９位のヌクレオチド位置、１０位のヌクレオチド位置から１７位のヌクレオチド位置、または１２位のヌクレオチド位置から１５位のヌクレオチド位置に位置する編集部をコードする）、拡張部分を含み得る。

【０１７７】

一部の実施形態において、拡張ガイド核酸のＣＲＩＳＰＲ核酸は、標的核酸の第１の鎖上の第１の部位に結合できる（実質的な相同性を有する）スペーサー配列を含む。

【０１７８】

一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質で有用なガイド核酸は、ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ｃｒＲＮＡ、ｃｒＤＮＡ）を含む。一部の実施形態において、第１のガイド核酸のＣＲＩＳＰＲ核酸は、標的核酸の第１の鎖上の第１の部位の上流（３’）にある標的核酸の第１の鎖上の第２の部位に結合するスペーサー配列を含む。

【０１７９】

一部の実施形態において、第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、逆転写酵素に融合されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であり得る。

【０１８０】

一部の実施形態において、第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグに融合されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ融合タンパク質であってもよく、逆転写酵素は、ペプチドタグを結合できる親和性ポリペプチドに融合された逆転写酵素ドメインを含む逆転写酵素融合タンパク質であってもよい。

【０１８１】

一部の実施形態において、第１のガイド核酸は、ＲＮＡ動員モチーフに連結されていてもよく、逆転写酵素は、ＲＮＡ動員モチーフを結合できる親和性ポリペプチドに融合された逆転写酵素ドメインを含む逆転写酵素融合タンパク質であり得る。

【０１８２】
一部の実施形態において、標的核酸は、５’－３’エキソヌクレアーゼとさらに接触されてもよく、場合によっては、５’－３’エキソヌクレアーゼは、第１のＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳエフェクタータンパク質と融合されている。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ペプチドタグに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であってもよく、そして、第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ペプチドタグと結合できる親和性ポリペプチドと融合した５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であってもよく、第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグに融合されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質であってもよい。一部の実施形態において、５’－３’エキソヌクレアーゼは、ＲＮＡ動員モチーフに結合できる親和性ポリペプチドに融合された５’－３’エキソヌクレアーゼを含む融合タンパク質であってもよく、拡張ガイド核酸は、ＲＮＡ動員モチーフに連結されている。

【０１８３】
一部の実施形態において、本発明は、標的核酸を１つまたは複数の一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ｓｓＤＮＡ　ＢＰ）と接触させることをさらに提供する。一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ｓｓＤＮＡ　ＢＰ）は、本発明の方法において生成される一本鎖ＤＮＡを安定化させるのに有用であり得る。いかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、ｓｓＤＮＡ　ＢＰは、ＤＮＡ鎖を分解から保護するか、あるいはＲＴが媒介するプライミングおよび重合にＤＮＡ鎖が利用できなくなるのを防ぎ得る。本発明で有用な一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質は、例示的なｓｓＤＮＡ　ＢＰから得られるものを含み得るが、それらに限定されるものではなく、ヒト、細菌またはファージ由来のものを含むが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、ｓｓＤＮＡ　ＢＰは、ｈＲａｄ５１（場合によってはｈＲａｄ５１＿Ｓ２０８Ｅ＿Ａ２０９Ｄ）（配列番号１２３）、ｈＲａｄ５２（配列番号１２４）、ＢｓＲｅｃＡ（配列番号１２５）、ＥｃＲｅｃＡ（配列番号１２６）、Ｔ４ｓｓＢ（配列番号１２７）および／またはＢｒｅｘ２７（配列番号１２８）を含むが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、標的核酸は、１つまたは複数のｓｓＤＮＡ　ＢＰと接触させられてもよく、ここで、ｓｓＤＮＡ　ＢＰは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質、第３のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質および／または第４のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質）のＣ末端またはＮ末端に融合されていてもよい。ｓｓＤＮＡ　ＢＰは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質／ドメインのＣ末端またはＮ末端に融合され得る。一部の実施形態において、ｓｓＤＮＡ　ＢＰは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質／ドメインおよび／またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質／ドメインと融合されている。

【０１８４】
一部の実施形態において、本発明の方法は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）の化学的阻害剤を導入することによって、ＮＨＥＪタンパク質を標的化するＣＲＩＳＰＲガイド核酸またはｓｉＲＮＡを導入してＮＨＥＪタンパク質の発現を一過的にノックダウンすることによって、またはＮＨＥＪを防ぐポリペプチドを導入することによって、二本鎖切断を低減させることをさらに含む。一部の実施形態において、ＮＨＥＪを防ぐポリペプチドは、Ｇａｍタンパク質を含み得るが、これに限定はされず、場合によってはＧａｍタンパク質は、エシェリヒアファージＭｕ　Ｇａｍタンパク質（例えば、配列番号１４７）である。

【０１８５】
一部の実施形態においては、拡張ガイド核酸が提供され、この拡張ガイド核酸は、（ｉ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ核酸もしくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸（ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｃｒＲＮＡ、Ｉ

Ｉ型またはＶ型ｃｒＤＮＡ）、および／またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ核酸もしくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ核酸とｔｒａｃｒ核酸（例えば、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＲＮＡ、ＩＩ型またはＶ型ｔｒａｃｒＤＮＡ）；ならびに（ｉｉ）プライマー結合部位および逆転写酵素鋳型（ＲＴ鋳型）（ＲＴＴ）を含む拡張部分を含む。一部の実施形態において、拡張ガイド核酸は、構造化ＲＮＡモチーフをさらに含み、場合によっては、構造化ＲＮＡモチーフは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置する。一部の実施形態において、構造化ＲＮＡモチーフは、ＡｓＣｐｆ１ＢＢ（配列番号１８９）、ボックスＢ（配列番号１９０）、シュードノット（デコイ）（配列番号９５、配列番号２０３）、シュードノット（ｔＥｖｏＰｒｅＱ１）（配列番号１９１）、ｆｍｐｋｎｏｔ（配列番号１９２）、ｍｐｋｎｏｔ（配列番号１９３）、ＭＳ２（配列番号１９４）、ＰＰ７（配列番号１９５）、ＳＬＢＰ（配列番号１９６）、ＴＡＲ（配列番号１９７）、および／またはＴｈｅｒｍｏＰｈ（配列番号１９８）を含み得るが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、構造化ＲＮＡモチーフは、シュードノットであり、場合によっては、シュードノットは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置する。一部の実施形態において、本発明で有用なシュードノットは、天然に存在するシュードノットまたは合成のシュードノットであり得る。本明細書において、シュードノットは、シュードノット様構造、シュードノット化ヘアピン、および／またはデコイシュードノット化ヘアピンとも呼ばれ得る。一部の実施形態において、シュードノットは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置し得る。一部の実施形態において、拡張ガイドが５’－３’ｃｒＲＮＡ－ＲＴＴ－ＰＢＳを含む場合、シュードノットはＲＴＴの５’またはＰＢＳの３’に位置し得る。一部の実施形態において、拡張ガイドがｃｒＲＮＡの５’末端に拡張部（拡張された部分）を含む場合、シュードノットはＲＴＴの３’またはＰＢＳの５’に位置し得る。一部の実施形態において、シュードノットは、拡張ガイド核酸の５’末端に位置していてもよく、それに続いて５’－３’の向きにＰＢＳ、次にＲＴＴ、ｃｒＲＮＡ中（例えば、反復配列中）の天然のシュードノット、次いで相補性領域（例えば、スペーサー配列）が続く。

【０１８６】

一部の実施形態において、拡張ガイドで有用なシュードノットは、配列番号１５８の核酸配列を含むｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノット、配列番号１９１の核酸配列を含むＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノット、および／または配列番号９５または配列番号２０３の核酸配列を含むシュードノットを含み得るが、これらに限定はされない。本発明の拡張ガイド核酸は、発現カセット中に含まれていてもよく、場合によっては発現カセットは、ベクター中に含まれている。

【０１８７】

一部の実施形態においては、（ａ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質；（ｂ）逆転写酵素、および（ｃ）拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ；例えば、ｔａｇＤＮＡ、ｔａｇＲＮＡ）を含む複合体が提供される。

【０１８８】

一部の実施形態において、複合体のＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質であってもよい。一部の実施形態において、複合体のＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、複合体のＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質は、ＲＮＡ動員モチーフに結合できる親和性ポリペプチドに融合されたＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質ドメインを含む融合タンパク質であり得る。

【０１８９】

一部の実施形態において、複合体の逆転写酵素は、ペプチドタグに融合された逆転写酵

素ドメインを含む融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、複合体の逆転写酵素は、ペプチドタグに結合できる親和性ポリペプチドに融合された逆転写酵素ドメインを含む融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、複合体の逆転写酵素は、ＲＮＡ動員ポリペプチドを結合できる親和性ポリペプチドに融合された逆転写酵素ドメインを含む融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、複合体は、ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ）をさらに含み得る。一部の実施形態において、複合体は、拡張ガイド核酸（例えば、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ、拡張ＣＲＩＳＰＲ　ＤＮＡ、拡張ｃｒＲＮＡ、拡張ｃｒＤＮＡ）をさらに含み得る。

【０１９０】

一部の実施形態において、複合体の拡張ガイド核酸は、さらにシュードノットを含み得る。一部の実施形態において、複合体の拡張ガイド核酸に含まれるシュードノットは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置し得る。一部の実施形態において、本発明の複合体の拡張ガイド核酸で有用なシュードノットは、天然に存在するシュードノットまたは合成シュードノットであり得る。本明細書において、シュードノットは、シュードノット様構造、シュードノット化ヘアピン、および／またはデコイシュードノット化ヘアピンとも呼ばれ得る。一部の実施形態において、シュードノットは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置し得る。一部の実施形態において、拡張ガイドが５’－３’ｃｒＲＮＡ－ＲＴＴ－ＰＢＳを含む場合、シュードノットはＲＴＴの５’またはＰＢＳの３’に位置し得る。一部の実施形態において、シュードノットは、配列番号１５８の核酸配列を含むｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノット、配列番号１９１の核酸配列を含むＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノット、または配列番号９５または配列番号２０３の核酸配列を含むシュードノットを含み得るが、これらに限定はされない。

【０１９１】

一部の実施形態において、本発明の複合体は、発現カセット中に含まれていてもよく、場合によっては、発現カセットは、ベクター中に含まれる。一部の実施形態において、本発明の複合体を含む発現カセットは、本明細書中に記載の生物における発現のためにコドン最適化されてもよく、場合によっては、生物は、ヒトなどの動物、植物、真菌、古細菌、細菌またはウイルスである。

【０１９２】

本発明はさらに、５’から３’の向きに（ａ）プロモーター配列をコードするポリヌクレオチド、（ｂ）生物における発現のためにコドン最適化されたＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）、ｄＣａｓ１２ａなど）またはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９、ｄＣａｓ９など）をコードするポリヌクレオチド；（ｃ）リンカー配列；ならびに（ｄ）生物における発現のためにコドン最適化された逆転写酵素をコードするポリヌクレオチドを含み、場合によっては生物は、ヒトなどの動物、植物、真菌、古細菌、細菌またはウイルスである、生物における発現のためにコドン最適化された発現カセットを提供する。さらには、５’から３’の向きに（ａ）植物特異的プロモーター配列をコードするポリヌクレオチド（例えば、ＺｍＵｂｉ１、ＭｔＵｂ２、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩ））、（ｂ）Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）、ｄＣａｓ１２ａなど）をコードする植物コドン最適化ポリヌクレオチド；（ｃ）リンカー配列；ならびに（ｄ）逆転写酵素をコードする植物コドン最適化ポリヌクレオチドを含む、植物における発現のためにコドン最適化された発現カセットが提供される。一部の実施形態において、リンカー配列は、本明細書中に記載のアミノ酸またはペプチドリンカーであり得る。一部の実施形態において、発現カセット中の逆転写酵素は、１つまたは複数のｓｓＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）に融合されていてもよい。

【０１９３】

本発明はさらに、（ａ）植物特異的プロモーター配列（例えば、ＺｍＵｂｉ１、ＭｔＵｂ２）をコードするポリヌクレオチド、および（ｂ）拡張ＲＮＡガイド配列を含む、植物

における発現のためにコドン最適化された発現カセットであって、ここで、前記拡張ガイド核酸は、その３’末端にプライマー結合部位および標的核酸に組み込まれる編集部を含む拡張部分を含み（例えば、逆転写酵素の鋳型）、場合によっては拡張ガイド核酸が発現カセットに含まれており、場合によっては拡張ガイド核酸がＰｏｌ　ＩＩプロモーターに作動可能に連結されている、発現カセットを提供する。

【０１９４】

一部の実施形態において、発現カセットは、構造化ＲＮＡモチーフをさらに含む拡張ガイド核酸を含み、場合によっては構造化ＲＮＡモチーフは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置する。一部の実施形態において、構造化ＲＮＡモチーフは、ＡｓＣｐｆ１ＢＢ（配列番号１８９）、ボックスＢ（配列番号１９０）、シュードノット（デコイ）（配列番号９５、配列番号２０３）、シュードノット（ｔＥｖｏＰｒｅＱ１）（配列番号１９１）、ｆｍｐｋｎｏｔ（配列番号１９２）、ｍｐｋｎｏｔ（配列番号１９３）、ＭＳ２（配列番号１９４）、ＰＰ７（配列番号１９５）、ＳＬＢＰ（配列番号１９６）、ＴＡＲ（配列番号１９７）、および／またはＴｈｅｒｍｏＰｈ（配列番号１９８）を含み得るが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、構造化ＲＮＡモチーフは、シュードノットであり、場合によってはシュードノットは、拡張ガイド核酸の３’末端に位置する。一部の実施形態において、拡張ガイドで有用なシュードノットは、配列番号１５８、配列番号１９１、配列番号９５および／または配列番号２０３の核酸配列を含むシュードノットを含み得るが、これらに限定はされない。

【０１９５】

一部の実施形態において、本発明の発現カセットで有用な植物特異的プロモーターは、イントロンと結合していてもよく、またはイントロンを含むプロモーター領域である（例えば、イントロンを含むＺｍＵｂｉ１；イントロンを含むＭｔＵｂ２）。

【０１９６】

一部の実施形態において、発現カセットは、双子葉植物における発現のためにコドン最適化されていてもよい。一部の実施形態において、発現カセットは、単子葉植物における発現のためにコドン最適化されていてもよい。

【０１９７】

一部の実施形態において、本発明は、本発明の１つまたは複数の発現カセットを植物または植物細胞に導入することを含み、それによって植物または植物細胞中の標的核酸を修飾し、修飾された標的核酸を含む植物または植物細胞を生成する、植物または植物細胞中の標的核酸を修飾する方法を提供する。一部の実施形態において、本発明の方法は、修飾された標的核酸を含む植物を生成するために、修飾された標的核酸を含む植物細胞から植物を再生させることをさらに含む。一部の実施形態において、本発明の方法は、約２０℃から４２℃（例えば、約２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、または４２℃、およびその中の任意の値または範囲）の温度で標的核酸を接触させることを含む。

【０１９８】

一部の実施形態において、本発明は、本発明の１つまたは複数のポリヌクレオチド、ガイド核酸、核酸構造体、発現カセットまたはベクターを含む細胞を提供する。

【０１９９】

ガイド核酸と組み合わせて使用する場合、本発明のポリヌクレオチド／核酸構造体／発現カセットは、標的核酸を修飾するために使用され得る。標的核酸は、標的核酸をガイド核酸に接触させる前、接触と同時、または接触させた後に、本発明のポリヌクレオチド／核酸構造体／発現カセットと接触させてもよい。一部の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドおよびガイド核酸は、同じ発現カセットまたはベクター中に含まれていてもよく、したがって、標的核酸は、本発明のポリヌクレオチドおよびガイド核酸に同時に接触され得る。一部の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドおよびガイド核酸は、異なる発現カセットまたはベクター中にあってもよく、したがって、標的核酸は、ガイド

核酸との接触の前、接触と同時、または接触の後に本発明のポリヌクレオチドに接触され得る。

【０２００】

本発明のポリヌクレオチドおよび方法を使用して、例えば、植物、動物、細菌、古細菌、真菌および／またはウイルスなどの、真核生物または原核生物を含むがこれらに限定されない、あらゆる生物の標的核酸が、修飾され得る（例えば、変異、例えば、塩基編集、切断、ニッキングなど）。本発明のポリヌクレオチドを使用して、昆虫、魚、鳥、両生類、爬虫類、および／または哺乳類を含むがこれらに限定されない、あらゆる動物またはその細胞が修飾され得る（例えば、変異、例えば、塩基編集、切断、ニッキングなど）。本発明が有用であり得る例示的な哺乳動物は、霊長類（ヒトおよび非ヒト（例えば、チンパンジー、ヒヒ、サル、ゴリラその他））、ネコ、イヌ、フェレット、スナネズミ、ハムスター、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ロバ、またはヒツジを含むが、これらに限定はされない。一部の実施形態において、真菌標的生物は、接合菌類、子嚢菌、担子菌および不完全菌（不完全菌類）を含み得るが、これらに限定はされず、場合によっては、真菌標的生物は子嚢菌、場合によっては酵母であり得る。一部の実施形態において、真菌標的生物はサッカロミセス属からのもの、場合によっては出芽酵母であり得る。

【０２０１】

本発明のポリヌクレオチドを使用して、あらゆる植物または植物部分の標的核酸が修飾され得る（例えば、変異、例えば、塩基編集、切断、ニッキングなど）。被子植物、裸子植物、単子葉植物、双子葉植物、Ｃ３、Ｃ４、ＣＡＭ植物、蘚苔門植物、シダおよび／またはシダの仲間、微細藻類、および／または大型藻類が挙げられるあらゆる植物（または植物の群、例えば属またはより高いオーダーの分類）が、本発明の核酸構造体を使用して修飾され得る。本発明に有用な植物および／または植物部分は、あらゆる植物種／変種／品種の植物および／または植物部分であり得る。本明細書中で用いられる用語「植物部分」は、以下に限定されないが、胚、花粉、胚珠、種子、葉、幹、シュート、花卉、枝、果実、仁、穂、コッブ、外皮、茎、根、根端、葯、植物細胞（植物および／または植物の部分において無傷の植物細胞、植物プロトプラスト、植物組織、植物細胞組織培養体、植物カルス、植物塊等が挙げられる）が挙げられる。本明細書中で用いられる「シュート」は、葉および幹を含む地上部を指す。さらに、本明細書中で用いられる「植物細胞」は、植物の構造的生理学的単位を指し、これは、細胞壁を含み、そしてまたプロトプラストを指し得る。植物細胞は、単離された単一の細胞の形態であってもよいし、培養された細胞であってもよいし、より高度に組織化された単位、例えば植物組織または植物器官の一部であってもよい。

【０２０２】

本発明に有用な植物の非限定的な例として、芝草（例えば、ブルーグラス、ベントグラス、ライグラス、ウシノケグサ属）、ウモウヨシ、ヒロハノコメススキ、ススキ属、ダンチク属、スイッチグラス、蔬菜作物（アーティチョーク、コールラビ、キバナスズシロ、ニラネギ、アスパラガス、レタス（例えば、サラダ菜、リーフレタス、タチチシャ）、マランガ、メロン（例えば、マスクメロン、スイカ、クレンショーメロン、ハネデューメロン、カンタループ）、アブラナ属作物（例えば、メキャベツ、キャベツ、カリフラワー、ブロッコリー、コラード、ケール、ハクサイ、パクチョイ）、カルドニ（ｃａｒｄｏｎｉ）、ニンジン、ハクサイ、オクラ、タマネギ、セロリ、パセリ、ヒヨコマメ、パースニップ、チコリ、コショウ、ジャガイモ、ウリ科植物（例えば、マロウ、キュウリ、ズッキーニ、スカッシュ、カボチャ、ハネデューメロン、スイカ、カンタループ）、ハツカダイコン、乾球タマネギ、ルタバガ、ナス、セイヨウゴボウ、キクヂシャ、エシャロット、エンダイブ、ニンニク、ホウレンソウ、ネギ、スカッシュ、グリーン、ビート（シュガービートおよび飼料ビート）、サツマイモ、フダンソウ、セイヨウワサビ、トマト、カブ、およびスパイスが挙げられる）、果実作物、例えば、リンゴ、アプリコット、チェリー、ネクタリン、モモ、西洋ナシ、プラム、プルーン、チェリー、マルメロ、イチジク、ナッツ（例えば、クリ、ペカン、ピスタチオ、ヘイゼルナッツ、ピスタチオ、ピーナッツ、クルミ

、マカダミアナッツ、アーモンド等）、柑橘類（例えば、クレメンタイン、キンカン、オレンジ、グレープフルーツ、タンジールミカン、ミカン、レモン、ライム等）、ブルーベリー、ブラックラズベリー、ボイゼンベリー、クランベリー、カランツ、グズベリー、ローガンベリー、ラズベリー、ストロベリー、ブラックベリー、ブドウ（ワイン用および食用）、アボカド、バナナ、キーウィ、柿、ザクロ、パイナップル、トロピカルフルーツ、梨状果、メロン、マンゴー、パパイア、およびライチ、農作物、例えば、クローバー、アルファルファ、チモシー、マツヨイグサ、メドウフォーム、トウモロコシ（飼料用、スイートコーン、ポップコーン）、ホップ、ホホバ、ソバ、ベニバナ、キノア、コムギ、イネ、オオムギ、ライムギ、キビ、モロコシ、エンバク、ライコムギ、モロコシ、タバコ、カポック、マメ科植物（インゲンマメ（例えば、サヤインゲンおよび乾燥インゲンマメ）、レンズマメ、エンドウ、ダイズ）、油料植物（ナタネ、キャノーラ、マスタード、ポピー、オリーブ、ヒマワリ、ココナッツ、ヒマシ油植物、カカオ豆、落花生類、アブラヤシ）、ウキクサ、シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）属、繊維植物（ワタ、アマ、アサ、ジュート）、カンナビス（例えば、アサ（Ｃａｎｎａｂｉｓ　ｓａｔｉｖａ）、インド麻（Ｃａｎｎａｂｉｓ　ｉｎｄｉｃａ）、およびカンナビス・ルデラリス（Ｃａｎｎａｂｉｓ　ｒｕｄｅｒａｌｉｓ））、クスノキ科（シナモン、カンファー）、もしくはコーヒー、サトウキビ、チャ、および天然ゴム植物等の植物、ならびに／または花壇用花卉、例えば、顕花植物、サボテン、多肉植物、および／もしくは観賞植物（例えば、バラ、チューリップ、スミレ）、ならびに樹木、例えば森林樹木（広葉樹および常緑植物、例えば針葉樹、例えば、ニレ、トネリコ、オーク、カエデ、モミ、トウヒ、スギ、マツ、カバノキ、イトスギ、ユーカリノキ、ヤナギ）、ならびに潅木および他の苗木が挙げられる。一部の実施形態において、本発明の核酸構造体および／またはそれをコードする発現カセットおよび／もしくはベクターは、トウモロコシ、ダイズ、コムギ、カノーラ、イネ、トマト、コショウ、ヒマワリ、ラズベリー、ブラックベリー、ブラックラズベリー、および／またはサクランボを修飾するために使用され得る。

【０２０３】

本発明はさらに、本発明の方法を実行するためのキットを含む。本発明のキットは、試薬、バッファ、および混合、測定、ソーティング、標識その他のための装置、ならびに標的核酸を修飾するのに適した説明書等を含み得る。

【０２０４】

一部の実施形態において、本発明は、１つまたは複数の本発明の核酸構築物および／またはそれを含む発現カセットおよび／もしくはベクターを含むキットと、それらの使用に関する任意選択の説明書を提供する。一部の実施形態において、キットは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド核酸（または拡張ガイド核酸）（本発明のポリヌクレオチドによってコードされるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に対応）および／またはそれを含む発現カセットおよび／もしくはベクターをさらに含み得る。一部の実施形態において、ガイド核酸／拡張ガイド核酸は、本発明の１つもしくは複数のポリヌクレオチドと同じ発現カセットおよび／またはベクター上に提供されてもよい。一部の実施形態において、ガイド核酸／拡張ガイド核酸は、本発明の１つまたは複数のポリヌクレオチドを含むものとは別個の発現カセットまたはベクター上に提供されてもよい。

【０２０５】

一部の実施形態において、キットはさらに、ガイド核酸をコードする核酸構造体を含んでもよく、構築体は、標的核酸配列と同一であるか、または相補的な核酸配列の、ガイド核酸の骨格中へのクローニングのためのクローニング部位を含む。

【０２０６】

一部の実施形態において、本発明の核酸構造体は、コードされたポリヌクレオチド内の１つまたは複数のイントロンをコードし得るｍＲＮＡであってもよい。一部の実施形態において、本発明の１つまたは複数のポリヌクレオチドを含む発現カセットおよび／またはベクターは、形質転換体の同定に有用な１つまたは複数の選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子、除草剤耐性遺伝子などをコードする核酸）をさらにコードしていてもよい

。
【０２０７】
次に、本発明を、以下の実施例に関して説明する。これらの実施例は、特許請求の範囲を本発明に限定することは意図されず、むしろ特定の実施形態の例示となることが意図されることが認識されるべきである。当業者が思い浮かべる、例示される方法におけるあらゆる変形が、本発明の範囲に入ることが意図される。
【実施例】
【０２０８】
対立遺伝子の、ＲＮＡによりコードされるＤＮＡ置換（ＲＥＤＲＡＷ）は、遊離ＤＮＡ３’末端（アニーリング部位、ＡＳ）と拡張ガイド核酸（すなわち、標的化対立遺伝子ガイドＲＮＡ（ｔａｇＲＮＡ））からのＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドから重合する酵素であるＶ型Ｃａｓエフェクターを利用する。これらの３つの巨大分子は、ｉ）ＣＲＩＳＰＲエフェクターとｔａｇＲＮＡのｃｒＲＮＡ部分を用いてＣＲＩＳＰＲ酵素を注目するゲノム部位に配置する、ｉｉ）ＤＮＡをニッキングまたは切断して遊離３’末端を生成する、ｉｉｉ）ＤＮＡの遊離３’末端にアニールするｔａｇＲＮＡの部分を提供する、ｉｖ）ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼの鋳型を提供するｔａｇＲＮＡの部分を提供する、ｖ）酵素の衝突、天然の終結、または安定なヘアピンとの遭遇のいずれかによって逆転写を終了させる、といった作業を連動して行う。
【０２０９】
我々は、ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８Ａの非標的鎖（ＮＴＳ）ニッカーゼバージョンとモロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭｕＬＶ）のＲＴを使用してＲＥＤＲＡＷ系を試験した。ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８Ａは、以前に記載されたＡｓＣａｓ１２ａ＿Ｒ１２２６Ａ変異とのアライメントに基づいて、ＮＴＳニッカーゼであることが予想された。我々は、図ＸＸＸにおいて、ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８Ａが確かにニッカーゼであることを実証している。使用されたＬｂＣａｓ１２ａは、ＲＮＡｓｅ（＋）であるか、ＲＮＡｓｅ活性を妨げる変異（Ｈ７５９Ａ）を有するもののいずれかであった。ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８Ａ＿Ｈ７５９Ａ変異体は、５’伸長を行う際、または３’ヘアピン（例えば、ヘアピン要素を含むシュードノット）を組み込む際のｔａｇＲＮＡの自己処理を防ぐために使用した。
【０２１０】
試験したｔａｇＲＮＡには、５’または３’拡張部のいずれかを含むｃｒＲＮＡが含まれていた。ニッキングされた非標的鎖からより短いまたはより長いＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドを形成できるように、様々なアニーリング部位の長さを試験した。様々な長さのＲＮＡ鋳型も同様に試験した。最後に、シュードノット化ヘアピン設計およびデコイシュードノット化ヘアピン設計の２つの異なるヘアピンもＬｂＣａｓ１２ａ　ｃｒＲＮＡ配列に組み込んだ。
【０２１１】
［実施例１］
ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８Ａニッカーゼアッセイ
ＬｂＣａｓ１２ａ、続いてヌクレオプラスミンＮＬＳ、および６×ヒスチジンタグ（ＧｅｎｅＷｉｚ）を含む核酸構造体（配列番号５７）を合成し、ＮｃｏＩとＸｈｏＩの間のｐＥＴ２８ａベクターにクローニングして、ｐＷＩＳＥ４５０（配列番号５８）を生成した。クローニングを容易にするために、Ｍｅｔ－１とＳｅｒ－２の間の配列に追加のグリシンを追加した。ここに提示されている番号付けでは、この余分なグリシンは除外されている。次に、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ＩＩ部位特異的変異誘発キット（Ａｇｉｌｅｎｔ）を製造元の指示に従って使用して、Ｒ１１３８Ａ変異を作製した。これらの発現プラスミドを用いてＢＬ２１（ＤＥ３）Ｓｔａｒ大腸菌コンピテントセル（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を形質転換した。
【０２１２】
ＢＬ２１（ＤＥ３）Ｓｔａｒ細胞をルリア培地と５０ｕｇ／ｍｌのカナマイシン中、３

７℃で光学密度Ａ６００＝０．５が得られるまで培養した。イソプロピルβ－ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を０．５ｍＭまで添加し、タンパク質を１８℃で一晩誘導した。細胞を５，０００×ｇでペレット化した。精製は、製造元のプロトコールに従って、ＨｉｓＴｒａｐカラムとそれに続くＭｏｎｏＳカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）の２つのカラムを使用して達成した。

【０２１３】

ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）は、Ｓｙｎｔｈｅｇｏによって、配列

【化２】

AAUUUCUACUAAGUGUAGAU**GGAAUCCCUUCUGCAGCACCUGG (SEQ ID NO:59)**

を使用して合成された（ガイド部分が太字で示されている）。

【０２１４】

切断されるプラスミドは、

【化３】

TTTCGGAATCCCTTCTGCAGCACCTGG (SEQ ID NO:60)

の配列が挿入されたｐＵＣ１９であり、ここで、配列の太字部分は、ＬｂＣａｓ１２ａによって認識されるＰＡＭ配列であり、残り（通常のフォント）はプロトスペーサー配列である。ｐＵＣ１９プラスミドをＸＬ１－Ｂｌｕｅ（Ａｇｉｌｅｎｔ）（大腸菌）中に形質転換し、その後、Ｑｉａｇｅｎプラスミドスピンミニキットを使用して精製した。

【０２１５】

ヌクレアーゼアッセイは、ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８：ｃｒＲＮＡ：プラスミドを１０：１０：１の比率で混合し、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓバッファー２．１中、３７℃で１５分間インキュベートすることによって達成し、８０℃で２０分間加熱不活化し、ＳＹＢＲ－Ｓａｆｅ染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）が埋め込まれた１％　ＴＡＥアガロースゲルにロードしてＤＮＡを染色した。図４のｉｎ　ｖｉｔｒｏのアッセイに示されているように、ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８Ａはニッカーゼである。レーン２および３に示されているように、野生型ＬｂＣａｓ１２ａによって二本鎖切断が生じるまでは（レーン３）、スーパーコイル化した２．８ｋＢのプラスミドが２．０ｋＢの見かけのサイズで泳動した（レーン２）。変異型酵素ＬｂＣａｓ１２ａ＿Ｒ１１３８Ａは主に、見かけのサイズが５．０ｋＢで泳動されるニッキングされた生成物を生じた。レーン４～６は、極度に高い濃度の酵素を使用してプラスミドの全般的なヌクレアーゼ消化が生じるまでは（２５６ｎＭ）、変異型酵素の濃度を増加させても、比率が変化しないことを示している。

【０２１６】

ＲＥＤＲＡＷエディタプラスミドの設計および構築－細菌のスクリーニング

ＲＥＤＲＡＷ（対立遺伝子の、ＲＮＡによりコードされるＤＮＡ置換）発現構築体を固相合成により合成し、発現ベクターｐＥＴ２８ａ（＋）のＮｃｏＩ制限部位とＸｈｏＩ制限部位との間にクローン化した。ＲＥＤＲＡＷ発現ベクターには、ＣｏｌＥ１複製起点、カナマイシン耐性マーカー、およびＴ７プロモーターおよびターミネーターの制御下にあるＲＥＤＲＡＷエディタが含まれている。ＲＥＤＲＡＷエディタには、ＸＴＥＮまたは５Ｒリンカーと共にＭｕ－ＬＶ逆転写酵素ＭｕＬＶ（５Ｍ）に融合されたＣａｓ１２ａニッカーゼ（Ｒ１１３８Ａ）またはＲｎａｓｅ不活化Ｃａｓ１２ａニッカーゼ（Ｒ１１３８Ａ、Ｈ７５９Ａ）が含まれている（例えば、配列番号９７参照）（Ｄ２００Ｎ＋Ｌ６０３Ｗ＋Ｔ３３０Ｐ＋Ｔ３０６Ｋ＋Ｗ３１３Ｆの５つの変異を持つマウス白血病ウイルス逆転写酵素）（Ａｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　５７６（７７８５）：１４９－１５７（２０１９））。ＲＥＤＲＡＷエディタの配列は全て、大腸菌のコドンに最適化されたものである。試験したＲＥＤＲＡＷエディタの構成を図５に示す。図５に提供されている２つの構成は、逆転写酵素のＮ末端にＣａｓ１２ａを有しており、２つの構成は逆転写酵素のＣ末端にＣａｓ１２ａを有していた。試験した構成は、５’拡張部を含むｔａｇ

ＲＮＡのプロセシングを防ぐために追加のＨ７５９Ａ変異を有するＣａｓ１２ａ変異体を使用して構築した。

【０２１７】

ｔａｇＲＮＡプラスミドの設計および構築　－　細菌のスクリーニング

ｔａｇＲＮＡ（標的対立遺伝子ガイドＲＮＡ）ライブラリの配列は、Ｃａｓ１２ａスペーサーおよびスキャフォールド配列を逆転写酵素鋳型および各標的に固有のプライマー結合部位と共に組み立てるアルゴリズムを使用して設計した。表１に示されている設計パラメータは、広い範囲のプライマー結合部位と逆転写酵素鋳型の長さにわたる。表３に示されている所望の変化は、編集に成功した後、抗生物質に対する耐性を付与するように設計されている。

【０２１８】

【表１】

表**1.** 第1のライブラリで試験したtagRNAのコンフォメーション

タイプ	**PBS**	**RTT**	ライブラリ内の標的
5'拡張	10-20nt、1ntステップ	10-150nt、5ntステップ	2ゲノム、3プラスミド
3'拡張	10-20nt、1ntステップ	10-150nt、5ntステップ	2ゲノム、3プラスミド

【０２１９】

図６は、第１のライブラリにおけるｔａｇＲＮＡの構成を示している。ＲＴＴおよびＰＢＳを含む５’および３’拡張部分の両方をライブラリに含めた。

【０２２０】

第２のライブラリは、第１のライブラリと同様な方法で設計したが、さらに、３’ｔａｇＲＮＡ拡張構成のスペーサーのちょうど３’に位置するヘアピンの存在がＲＥＤＲＡＷ編集を改善するかどうかを評価した。表２に示されている設計パラメータは、ここでもプライマー結合部位（ＰＢＳ）と逆転写酵素鋳型（ＲＴＴ）の長さを広範囲に調べるものであるが、第１のライブラリから機能的であることが判明したＲＴＴ長の領域に焦点を当てたものである。ＲＴＴおよびＰＢＳを含む５’および３’拡張部分の両方をライブラリに含めた。さらに、デコイヘアピンを含む変異体も、第２のｔａｇＲＮＡライブラリに含めた。天然のＬｂＣａｓ１２ａのスキャフォールド配列に似ているが、Ｃａｓ１２ａタンパク質によって認識および切断されないヘアピンが望まれていたため、ＬｂＣａｓ１２ａヘアピンに似たアーキテクチャを持つ既存のヘアピンをＨＩＶ－１　ＲＮＡゲノムから見つけ、ＵＡ配列を追加して図７に示されるようなシュードノットを形成させるように修飾した。

【０２２１】

【表２】

表**2**. 第2のライブラリで試験したtagRNAのコンフォメーション

TagRNA 拡張	**PBS**の範囲	**RTT**の範囲	デコイヘアピン	標的
5'末端	10-20nt、1-ntステップ	10-190nt、5-ntステップ	なし	2ゲノム、3プラスミド
3/末端	10-20nt、1-ntステップ	10-190nt、5-ntステップ; 65-85nt、2-ntステップ	ありとなし	2ゲノム、3プラスミド

【０２２２】

細菌スクリーニングのためのｔａｇＲＮＡプラスミド構築

ｔａｇＲＮＡライブラリのベースプラスミドは、固相合成とホルダー断片のｐＴｗｉｓ

ｔ Ａｍｐ Ｍｅｄｉｕｍ Ｃｏｐｙ（ＴＷＩＳＴ ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ（登録商標））へのクローニングによって生成した。このプラスミドには、ｐ１５Ａ複製起点とアンピシリン耐性マーカーが含まれている。ｔａｇＲＮＡは合成ＢｂａＪ２３１１９プロモーターから構成的に発現され、Ｔ７ターミネーターによって停止される。評価した第１のｔａｇＲＮＡライブラリは、外部ベンダー（Ｇｅｎｅｗｉｚ）によって合成され、ｔａｇＲＮＡベースベクターにクローン化された。第２のライブラリでは、製造元の指示に従ってＮＥＢ ＨｉＦｉアセンブリキットを使用して、オリゴを合成し、ｔａｇＲＮＡベースベクターにクローニングした。ライブラリの多様性は、ライブラリからの７２クローンのコロニーＰＣＲおよびサンガー配列決定によって調査し、広い範囲のＰＢＳ、ＲＴＴ、および標的がライブラリに含まれていること、および実質的な偏りがないことを確認した。

【０２２３】

レポータープラスミドの設計および構築

ＣｌｏＤＦ１３複製起点およびクロラムフェニコール耐性マーカーをＰＣＲ増幅し、それをＰＣＲ増幅したａａｄＡ耐性マーカーと連結することによって、ＣｌｏＤＦ１３複製起点、クロラムフェニコール耐性マーカー、およびスペクチノマイシン耐性マーカー（ａａｄＡ）を含むベースレポータープラスミドを構築した。次に、野生型ａａｄＡ遺伝子をＢａｍＨＩとＢｇｌＩＩ制限部位の間で切り出し、残基位置Ｔｈｒ６１、Ｌｅｕ１１５、Ａｓｐ１３２に停止コドンを含む合成遺伝子ブロックを連結して、ａａｄＡの変異体を含む、３種類のレポータープラスミドを構築した。レポータープラスミドは全て、構築後にサンガー配列決定によって検証した。さらに、コード配列にストップコドンを持つａａｄＡ変異体を含むレポータープラスミドをＲＥＤＲＡＷ ｔａｇＲＮＡスクリーニング実験に使用する前に、スペクチノマイシンおよびストレプトマイシン感受性の両方について検証した。

【０２２４】

ＲＥＤＲＡＷ編集の標的－細菌スクリーニング

ＲＥＤＲＡＷの編集実験では、以下の表３に示す５つの標的を試験した。全ての場合において、２つのゲノム標的と３つのプラスミド標的を使用した。いずれかの標的でＲＥＤＲＡＷ編集が成功すると、抗生物質（ナリジクス酸またはストレプトマイシン）に対する耐性が生じ、宿主生物（大腸菌）の生存をＲＥＤＲＡＷ編集の成功に結びつける。

【０２２５】

【表３】

表3. 細菌のREDRAW編集の標的

標的	標的の位置	所望の編集	成功した編集の結果
gyrA	ゲノム	Ser83>Leu TCG>TTG	ナリジクス酸に対する耐性
rpsL	ゲノム	Lys44>Arg AAA>CGT	ストレプトマイシンに対する耐性
aadA	プラスミド	Stop61>Thr TGA>ACG	ストレプトマイシンに対する耐性
aadA	プラスミド	Stop115>Leu TGA>CTG	ストレプトマイシンに対する耐性
aadA	プラスミド	Stop132>Asp TGA>GAT	ストレプトマイシンに対する耐性

【０２２６】

ＲＥＤＲＡＷ ｔａｇＲＮＡ実験 － 細菌スクリーニング

全ての細菌ＲＥＤＲＡＷ ｔａｇＲＮＡスクリーニング実験の宿主生物は、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）であった。セレクション実験を行う前に、各ＲＥＤＲＡＷ発現構築体を用

いて、製造元の指示に従って化学コンピテントＢＬ２１（ＤＥ３）を形質転換し、カナマイシンを含むＬＢ寒天プレート上にプレーティングした。その後、形質転換プレートから単一のコロニーを採取し、以前に開発された方法に従ってエレクトロコンピテント細胞のバッチを作製した（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ａｎｄ　Ｒｕｓｓｅｌｌ（Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｅ．ｃｏｌｉ　ｂｙ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ．Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　２００６．１（２００６）：ｐｄｂ－ｐｒｏｔ３９３３）。次に、各ＲＥＤＲＡＷ発現構築体を保有するコンピテントセルを１０ｎｇの各レポータープラスミドを用いてエレクトロポレーションし、３７℃、２２５ｒｐｍのＳＯＣで１時間回復させ、カナマイシンとクロラムフェニコールを加えたＬＢ寒天プレート上にプレーティングした。その後、これらのプレートからの単一のコロニーを形質転換プレートから採取し、再びエレクトロコンピテントセルのバッチを作製した（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ａｎｄ　Ｒｕｓｓｅｌｌ（Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｅ．ｃｏｌｉ　ｂｙ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ．Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　２００６．１（２００６）：ｐｄｂ－ｐｒｏｔ３９３３）。以下の表４は、第１のｔａｇＲＮＡライブラリの試験用に作られたエレクトロコンピテントセルのバッチをまとめたものである。

【０２２７】

【表４】

表1-tagRNAライブラリ1セレクション実験用に調製されたエレクトロコンピテントセル

コンピテントセルのバッチ	BL21(DE3)中に保有される構築体	配列番号
1	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRRLbCas12a-SV40	63
2	SV40-MMLV-RT-5R-nRRLbCas12a-SV40	64
3	SV40-nRRLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40	65
4	SV40-nRRLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40	66
5	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRVRLbCas12a-SV40	67
6	SV40-MMLV-RT-5R-nRVRLbCas12a-SV40	68
7	SV40-nRVRLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40	69
8	SV40-nRVRLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40	70
9	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 + aadA Thr61	71 + Thr61
10	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 + aadA Leu115	71 + Leu115
11	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 + Asp132	71 + Asp132
12	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 + Thr61	72 + Thr61
13	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 + Leu115	72 + Leu115
14	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 + Asp132	72 + Asp132
15	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 + Thr61	73 + Thr61
16	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 + Leu115	73 + Leu115
17	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 + Asp132	73 + Asp132
18	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40+ Thr61	74 + Thr61
19	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40+ Leu115	74 + Leu115
20	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40+ Asp132	74 + Asp132

SV40=NLS、MMLV-RT=逆転写酵素、XTEN=リンカー、nLbCas12a=ニッカーゼCas12

【０２２８】

セレクション実験は、まず１００ｎｇのｔａｇＲＮＡライブラリを各バッチのエレクトロコンピテントセル５０ｕＬにエレクトロポレーションすることにより行った。２２５ｒｐｍで振盪しながら３７℃で１時間かけて形質転換を回復させた。１時間の回復後、１ｕＬの回復物を取り出し、９９ｕＬのＬＢと混合し、適切な抗生物質を含むＬＢ寒天プレート上にプレーティングして、形質転換効率をチェックした。その後、各形質転換体の残りの量を、２９ｍＬのＬＢ＋抗生物質（ゲノムセレクション用ＬＢ　Ｋａｎ／Ｃａｒｂ、プラスミドセレクション用ＬＢ　Ｋａｎ／Ｃａｒｂ／Ｃａｍ）および０．５ｍＭ　ＩＰＴＧに加えた。発現培養物を、２２５ｒｐｍで振盪しながら３７℃で一晩増殖させた。

【０２２９】

翌日、各発現培養物のＯＤ６００を測定した。各発現培養物について、１ＯＤをＲＥＤＲＡＷ発現ベクター（Ｋａｎ）、ｔａｇＲＮＡプラスミド（Ｃａｒｂ）、レポータープラスミドに対する抗生物質、０．５ｍＭ　ＩＰＴＧ、および追加の選択抗生物質（ナリジクス酸またはストレプトマイシン）を含む５枚のプレート（プレートあたり約０．２ＯＤ）上に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、翌朝、増殖を観察

した。コロニーが観察されなかった場合、プレートを３７℃でさらに２４時間インキュベートした。

【０２３０】

選択プレート上で観察されたコロニーを採取し、適切な抗生物質を含むプレート上に再度画線塗布し、編集の標的の遺伝子およびサンガー配列決定用のｔａｇＲＮＡを増幅するためにコロニーＰＣＲを行った。サンガー配列決定は、ＧｅｎｅｗｉｚによってコロニーＰＣＲ産物に対して行われた。

【０２３１】

第２のライブラリの評価は、１つの変更を加えて、第１のｔａｇＲＮＡライブラリと同じ方法で行った。２０バッチのエレクトロコンピテントセルを調製する代わりに、第２のｔａｇＲＮＡライブラリを保有するエレクトロコンピテントＢＬ２１（ＤＥ３）の１つの大きなバッチを調製した。その後、ＲＥＤＲＡＷ発現構築体（１００ｎｇ）またはＲＥＤＲＡＷ発現構築体＋レポータープラスミド（各１００ｎｇ）を用いて、ｔａｇＲＮＡライブラリを保有するエレクトロコンピテントセルを形質転換した。その後の全てのステップを同じ方法で繰り返した。

【０２３２】

第１のｔａｇＲＮＡライブラリによるＲＥＤＲＡＷ編集の評価－細菌スクリーニング

第１のｔａｇＲＮＡライブラリのセレクション実験で得られたコロニー数を、以下の表５にまとめる。ゲノムセレクション（セレクション１～８）のいずれでもコロニーは観察されなかった。各プラスミドセレクションでは、コロニーが観察された。

【０２３３】

【表５】

表5. 第1のtagRNAライブラリセレクション実験の結果。

セレクション番号	REDRAWエディタ	標的	選択プレート上のコロニー
1	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRRLbCas12a-SV40 (配列番号63)	gyrA (ゲノム)	0
2	SV40-MMLV-RT-5R-nRRLbCas12a-SV40 (配列番号64)	gyrA (ゲノム)	0
3	SV40-nRRLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (配列番号65)	gyrA (ゲノム)	0
4	SV40-nRRLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (配列番号66)	gyrA (ゲノム)	0
5	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRVRLbCas12a-SV40 (配列番号67)	rpsL (ゲノム)	0
6	SV40-MMLV-RT-5R-nRVRLbCas12a-SV40 (配列番号68)	rpsL (ゲノム)	0
7	SV40-nRVRLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (配列番号69)	rpsL (ゲノム)	0
8	SV40-nRVRLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (配列番号70)	rpsL (ゲノム)	0
9	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 (配列番号71)	aadA Thr61 (プラスミド)	菌叢
10	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 (配列番号71)	aadA Leu115 (プラスミド)	11
11	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 (配列番号71)	aadA Asp132 (プラスミド)	9
12	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 (配列番号72)	aadA Thr61 (プラスミド)	菌叢
13	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 (配列番号72)	aadA Leu115 (プラスミド)	10
14	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 (配列番号72)	aadA Asp132 (プラスミド)	9
15	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (配列番号73)	aadA Thr61 (プラスミド)	菌叢
16	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (配列番号73)	aadA Leu115 (プラスミド)	1
17	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (配列番号73)	aadA Asp132 (プラスミド)	1
18	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (配列番号74)	aadA Thr61 (プラスミド)	菌叢
19	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (配列番号74)	aadA Leu115 (プラスミド)	2
20	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (配列番号74)	aadA Asp132 (プラスミド)	0

【０２３４】

セレクション９、１２、１５、１８（ａａｄＡ　Ｔｈｒ６１標的）については、細菌叢が観察された。これらのプレートから単離されたコロニーは偽陽性であった。セレクション１０、１１、１３、１４、１６、および１７（ａａｄＡ　Ｌｅｕ１１５標的およびａａｄＡ　Ａｓｐ１３２標的）については、プレート上で少数のコロニーが観察された。これらのプレート上のコロニーは、コロニーＰＣＲによって増幅されたｔａｇＲＮＡと標的の両方を有しており、編集が行われたことを確認し、編集に関与したｔａｇＲＮＡを同定するためにサンガー配列決定へと送られた。セレクション１１、１４、１７、および２０からの評価された全てのコロニー（ａａｄＡ　Ａｓｐ１３２標的）は偽陽性であった。セレ

クション１０からの複数のコロニー（ａａｄＡ　Ｌｅｕ１１５標的）が、設計された編集部および関連するｔａｇＲＮＡを有していた。編集された標的の配列決定の結果を図８に示すが、これは、機能停止したａａｄＡ遺伝子におけるＴＧＡ→ＣＴＧ編集と抗生物質耐性の回復を実証している。

【０２３５】

編集に関与したｔａｇＲＮＡの同定された配列は、図８に示す編集部に関連付けられる：5'- GTTTCAAAGATTAAATAATTTCTACTAAGTGTAGATTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGTAATTTCTACTAAGTGTAGATGCGGCGCGTTGTTTCATCAAGGCGTACGGTCACCGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGG - 3'（配列番号８７）。

【０２３６】

セレクション１０のタンパク質の構成は以下の通りである：ＳＶ４０－ｎＣａｓ１２ａ－ＸＴＥＮ－ＭＭＬＶ－ＲＴ－ＳＶ４０。

【０２３７】

第２のｔａｇＲＮＡライブラリによるＲＥＤＲＡＷ編集の評価　－　ゲノムセレクションの結果

第２のｔａｇＲＮＡライブラリのゲノムセレクション実験で得られたコロニー数を、以下の表６にまとめる。ｒｐｓＬ選択プレート上でコロニーが観察された。

【０２３８】

【表６】

表6. 第2のtagRNAライブラリの実験結果-ゲノムセレクション用の選択プレート上のコロニー

セレクション番号	REDRAWエディタ	標的	選択プレート上のコロニー
2.1	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRRLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号75**)	gyrA (ゲノム)	0
2.2	SV40-MMLV-RT-5R-nRRLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号76**)	gyrA (ゲノム)	0
2.3	SV40-nRRLbCas12a(H759A)-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号77**)	gyrA (ゲノム)	0
2.4	SV40-nRRLbCas12a(H759A)-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号78**)	gyrA (ゲノム)	0
2.5	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRVRLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号79**)	rpsL(ゲノム)	5
2.6	SV40-MMLV-RT-5R-nRVRLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号80**)	rpsL (ゲノム)	8
2.7	SV40-nRVRLbCas12a(H759A)-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号81**)	rpsL (ゲノム)	2
2.8	SV40-nRVRLbCas12a(H759A)-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号82**)	rpsL (ゲノム)	11
2.9	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRRLbCas12a-SV40 (**配列番号63**)	gyrA (ゲノム)	0
2.10	SV40-MMLV-RT-5R-nRRLbCas12a-SV40 (**配列番号64**)	gyrA (ゲノム)	0
2.11	SV40-nRRLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号65**)	gyrA (ゲノム)	0
2.12	SV40-nRRLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号66**)	gyrA (ゲノム)	0
2.13	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRVRLbCas12a-SV40 (**配列番号67**)	rpsL (ゲノム)	3
2.14	SV40-MMLV-RT-5R-nRVRLbCas12a-SV40 (**配列番号68**)	rpsL (ゲノム)	0
2.15	SV40-nRVRLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号69**)	rpsL (ゲノム)	0
2.16	SV40-nRVRLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号70**)	rpsL (ゲノム)	1

【０２３９】

セレクション２．１～２．４および２．９～２．１２（ｇｙｒＡゲノム標的）については、プレート上にコロニーが観察されなかった。セレクション２．５～２．８および２．１３～２．１６（ｒｐｓＬゲノム標的）については、これらのプレート上で少数のコロニーが観察された。これらのプレート上のコロニーを再度画線塗布して、全ての抗生物質に対する耐性を確認した。次に、これらのプレートからのコロニーを使用して、サンガー配列決定のためにｔａｇＲＮＡと標的のＰＣＲ産物を作製した。サンガー配列決定を使用して、行われた編集を確認し、編集に関与したｔａｇＲＮＡを同定した。セレクション２．６～２．８および２．１３～２．１６のコロニーは、全て偽陽性であった。セレクション

２．５からの１つのコロニーは、ストレプトマイシン耐性を付与するＡＡＡからＣＧＴへの設計された編集を有していた（図９参照）。

【０２４０】

図９に示されている編集に関連するｔａｇＲＮＡの同定された配列は、以下のとおりである：

5'- TATTTCTATAAGTGTAGATTACTCGTGTATATATACTCCGCACCGAGGTTGGTACGAACACCGGGAGTCTTTAACACGACCGCCACGGATCAGGATCACGGAGTGCTCCTGCAGGTTGTGACCTTCACCACCGATGTAGGAAGTCACTTCGAAACCGTTAGTCAGACGAACACGGCATACTTTACGCAGCGCGGAGTTCGGTTTACGAGGAGTGGTAGTATATACACGAGT- 3' 配列番号９２。

【０２４１】

セレクション２．５のタンパク質の構成は以下のとおりである：ＳＶ４０－ＭＭＬＶ－ＲＴ－ＸＴＥＮ－ｎＲＶＲＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）－ＳＶ４０。

【０２４２】

第２のｔａｇＲＮＡライブラリによるＲＥＤＲＡＷ編集の評価　－　プラスミドセレクションの結果

第２のｔａｇＲＮＡライブラリのプラスミドセレクション実験で得られたコロニー数を、以下の表７にまとめる。

【０２４３】

【表７】

表7.

セレクション番号	REDRAWエディタ	標的	選択プレート上のコロニー
2.17	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 (**配列番号71**)	aadA Thr61 (プラスミド)	0
2.18	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 (**配列番号71**)	aadA Leu115 (プラスミド)	4
2.19	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 (**配列番号71**)	aadA Asp132 (プラスミド)	2
2.20	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 (**配列番号72**)	aadA Thr61 (プラスミド)	0
2.21	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 (**配列番号72**)	aadA Leu115 (プラスミド)	0
2.22	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a-SV40 (**配列番号72**)	aadA Asp132 (プラスミド)	1
2.23	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号73**)	aadA Thr61 (プラスミド)	0
2.24	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号73**)	aadA Leu115 (プラスミド)	0
2.25	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号73**)	aadA Asp132 (プラスミド)	9
2.26	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号74**)	aadA Thr61 (プラスミド)	0
2.27	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号74**)	aadA Leu115 (プラスミド)	0
2.28	SV40-nLbCas12a-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号74**)	aadA Asp132 (プラスミド)	2
2.29	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号83**)	aadA Thr61 (プラスミド)	0
2.30	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号83**)	aadA Leu115 (プラスミド)	0
2.31	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号83**)	aadA Asp132 (プラスミド)	12
2.32	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号84**)	aadA Thr61 (プラスミド)	0
2.33	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号84**)	aadA Leu115 (プラスミド)	0
2.34	SV40-MMLV-RT-5R-nLbCas12a(H759A)-SV40 (**配列番号84**)	aadA Asp132 (プラスミド)	0
2.35	SV40-nLbCas12a(H759A)-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号85**)	aadA Thr61 (プラスミド)	0

2.36	SV40-nLbCas12a(H759A)-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号85**)	aadA Leu115 (プラスミド)	0
2.37	SV40-nLbCas12a(H759A)-XTEN-MMLV-RT-SV40 (**配列番号85**)	aadA Asp132 (プラスミド)	0
2.38	SV40-nLbCas12a(H759A)-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号85**)	aadA Thr61 (プラスミド)	0
2.39	SV40-nLbCas12a(H759A)-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号86**)	aadA Leu115 (プラスミド)	1
2.40	SV40-nLbCas12a(H759A)-5R-MMLV-RT-SV40 (**配列番号86**)	aadA Asp132 (プラスミド)	2

【０２４４】

Ｌｅｕ１１５とＡｓｐ１３２セレクションのプレート上でコロニーが観察された。セレクション２．１８、２．１９、２．２２、２．２５、２．２８、２．３１、２．３９、２．４０は、選択プレート上にコロニーを形成した。これらのコロニーを再度画線塗布して、全ての抗生物質に対する耐性を確認した。次に、それらを使用して、サンガー配列決定のためにｔａｇＲＮＡと標的のＰＣＲ産物を作製した。サンガー配列決定を使用して、行われた編集を確認し、編集に関与したｔａｇＲＮＡを同定した。セレクション２．１８、２．１９、２．２２、２．２８、２．３９、および２．４０からのコロニーは、全て偽陽性であった。図１０および図１１に示されているように、セレクション２．２５からの４つのコロニーとセレクション２．３１からの２つのコロニーは、設計された編集および関連するｔａｇＲＮＡを有していた。セレクション２．２５からの４つのコロニーは、同一の編集とｔａｇＲＮＡを有していた。セレクション２．３１からの２つのコロニーも、同一の編集およびｔａｇＲＮＡを有していた。

【０２４５】

セレクション２．２５からの図１０の編集に関連するｔａｇＲＮＡの同定された配列は、以下のとおりである：

5'- TAATTTCTACTAAGTGTAGATTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGTAAGTCTCCATAGAATGGAGGACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCGCGGCGCGTTGTTTCATCAAGGCGTACGGTCACCGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAT- 3'

配列番号９３。

【０２４６】

セレクション２．２５のタンパク質の構成は以下の通りである：ＳＶ４０－ｎＣａｓ１２ａ－ＸＴＥＮ－ＭＭＬＶ－ＲＴ－ＳＶ４０

【０２４７】

セレクション２．３１からの図１１の編集に関連するｔａｇＲＮＡの同定された配列は、以下のとおりである：

5'-TAATTTCAACTAAGTGTAGATTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGTAAGTCTCCATAGAATGGAGGGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCGCGGCGCGTTGTTTCATCAAGGCGTACGGTCACCGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAT - 3' 配列番号９４。

【０２４８】

セレクション２．３１のタンパク質の構成は以下のとおりである：ＳＶ４０－ＭＭＬＶ－ＲＴ－ＸＴＥＮ－ｎＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９）－ＳＶ４０。

【０２４９】
細菌細胞において観察されたＲＥＤＲＡＷ編集の概要
以下の表８は、大腸菌で観察されたＲＥＤＲＡＷ編集の事例をまとめたものである。各例について、タンパク質の構成（ＲＥＤＲＡＷエディタ）、編集された標的、ｔａｇＲＮＡの拡張位置（Ｃａｓ１２ａヘアピンおよびガイドの５’または３’）、ＰＢＳ長、およびＲＴＴ長が記述されている。
【０２５０】
【表８】
表8.大腸菌で観察されたREDRAW編集の概要。

セレクション	REDRAWエディタ	標的	拡張	PBSの長さ(bp)	RTTの長さ
10	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a-SV40 (配列番号71)	aadA Leu115 (プラスミド)	3'	17	96 bp
2.5	SV40-MMLV-RT-XTEN-nRVRLbCas12a(H759A)-SV40 (配列番号79)	rpsL (ゲノム)	3'	17	175 bp
2.25	SV40-nLbCas12a-XTEN-MMLV-RT-SV40 (配列番号73)	aadA Asp132 (プラスミド)	3'	12	140 bp + 21 bp デコイヘアピン*
2.31	SV40-MMLV-RT-XTEN-nLbCas12a(H759A)-SV40 (配列番号83)	aadA asp132 (プラスミド)	3'	12	140 bp + 21 bp デコイヘアピン*

*デコイヘアピン配列: TAAGTCTCCATAGAATGGAGG　配列番号95.

【０２５１】
［実施例２］
ヒト細胞における精密編集活性
Ｃａｓ１２ａの活性型を逆転写酵素と組み合わせて使用する更なるアプローチを図１２に示し、以下に概説する。
・ヌクレアーゼ活性を持つＣａｓ１２ａは、スペーサーと標的部位の相互作用により、この部位に動員される。
・Ｃａｓ１２ａは二本鎖の切断を行う。場合によっては、非鋳型鎖を分解するために５’から３’へのエキソヌクレアーゼが提供される。
・プライミングはｔａｇＲＮＡを使用して行われる。プライマー結合部位（ＰＢＳ）は、切断部位の右側にある、鋳型鎖ＤＮＡに相補的な配列をコードしている。
・逆転写酵素（ＭＭｕＬＶ－ＲＴ（５Ｍ））は、標的核酸上のプライミング部位またはプライマーから伸長し（破線＝伸長）、新たに合成された鎖の中に所望の変化をコードする。
・ミスマッチ修復およびＤＮＡライゲーションによるＤＮＡ中間体の解消により、編集された新しいＤＮＡ鎖が生成される。
【０２５２】
方法：
拡張ガイドＲＮＡは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の２つのゲノム部位、ＤＭＮＴ１およびＦＡＮＣＦ１を標的とするように設計した。プライマー結合部位（ＰＢＳ）および逆転写酵素鋳型（ＲＴＴ）の長さの様々な組合せをアッセイした。ガイドＲＮＡは、標的ガイドのＰＡＭ領域における２つの塩基の変更をコードしており、これらは－２および－３の位置でのＴＴからＡＡに対応している（ＴＴＴＶ　ＰＡＭを－４から－１の位置として数える）

。ガイド拡張部は、ガイドＲＮＡの５’または３’末端のいずれかに融合させた。

【０２５３】

ＲＮＡｓｅ不活化変異体ＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５８Ａ）、逆転写酵素（ＭＭｕＬＶ－ＲＴ（５Ｍ））、および場合によってはエキソヌクレアーゼ（Ｔ５エキソヌクレアーゼ、Ｔ７エキソヌクレアーゼ、ＲｅｃＥ、ＲｅｃＪのうちの１つ）、および拡張ガイドＲＮＡをコードするプラスミドを、製造元のプロトコールに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）３０００を用いて、７０％のコンフルエンスで培養したＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした。３日後に細胞を回収し、次世代配列決定によって遺伝子編集を定量化した。

【０２５４】

結果：

我々は、標的化した両方の部位で意図された精密な編集を観察した。ガイドの設計に応じて、我々はＦＡＮＣＦ１部位で最大０．５％の編集を観察し（図１３）、ＤＭＮＴ１部位では最大１．７％の編集を観察した（図１４）。エキソヌクレアーゼを使用すると、一部のガイド設計で編集効率が向上した。

【０２５５】

【表９】

表 **9.** FANCF1 部位を標的化するために使用したガイド設計(図 **13**)。

FANCF1				
pWISE	3'または5'	RTT の長さ (塩基)	PBS の長さ (塩基)	% 精密編集
pWISE878	N/A	0	0	0
pWISE2928	3'	74	48	0.17289
pWISE2929	3'	52	48	0.54658
pWISE2930	3'	44	48	0.10525
pWISE2931	3'	36	48	0
pWISE2932	3'	74	24	0.28148
pWISE2934	3'	44	24	0
pWISE2935	3'	36	24	0
pWISE2936	3'	74	16	0
pWISE2937	3'	52	16	0.20349
pWISE2938	3'	44	16	0.12821
pWISE2940	3'	74	8	0
pWISE2941	3'	52	8	0
pWISE2942	3'	44	8	0
pWISE2943	3'	36	8	0
pWISE2945	5'	52	48	0
pWISE2946	5'	44	48	0
pWISE2947	5'	36	48	0.10335
pWISE2948	5'	74	24	0
pWISE2949	5'	52	24	0
pWISE2950	5'	44	24	0
pWISE2951	5'	36	24	0

【０２５６】

【表１０】

表 **10.** DMNT1 部位を標的化するために使用したガイド設計(図 **14**)。

DMNT1				
pWISE	3'または5'	RTT の長さ(塩基)	PBS の長さ(塩基)	%精密編集
pWISE258	N/A	0	0	0
pWISE2960	3'	74	48	0.77529
pWISE2961	3'	52	48	0.3139
pWISE2963	3'	36	48	1.17854
pWISE2966	3'	44	24	0.30752
pWISE2967	3'	36	24	0.71539
pWISE2971	3'	36	16	0.96806
pWISE2973	3'	52	8	0.23422
pWISE2975	3'	36	8	0.53485
pWISE2976	5'	74	48	0.33196
pWISE2977	5'	52	48	0.77164
pWISE2978	5'	44	48	1.17289
pWISE2979	5'	36	48	1.72435
pWISE2980	5'	74	24	0.3538
pWISE2981	5'	52	24	0.44055
pWISE2982	5'	44	24	0.55662
pWISE2983	5'	36	24	1.55194

【０２５７】

【表１１】

表11.例示的な拡張ガイド核酸(tagRNAs)

pWISE	名称/配列番号	Cas12a種	スペーサー	tagRNA拡張配列	意図された精密編集(PAMは-4位、-3位、-2位、-1位として示されている)
pWISE 2960	tagRNA 173	LbCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	ACAGCAGGCCTTTGGTCAGGTTGG CTGCTGGGCTGGCCCTGGGGCCGT AACCCTCACTCCTGCTCGGTGAATT TGGCTCAGCAGGCACCTGCCTCAG CTGCTCACTTGAGCCTCTGGGTCTA	(-3、-2)位におけるTTからAA
pWISE 2961	tagRNA 174	LbCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	GGCTGCTGGGCTGGCCCTGGGGCC GTAACCCTCACTCCTGCTCGGTGAA TTTGGCTCAGCAGGCACCTGCCTC AGCTGCTCACTTGAGCCTCTGGGTC TA	(-3、-2)位におけるTTからAA
pWISE 2962	tagRNA 175	LbCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	GGCTGGCCCTGGGGCCGTAACCCT CACTCCTGCTCGGTGAATTTGGCTC AGCAGGCACCTGCCTCAGCTGCTC ACTTGAGCCTCTGGGTCTA	(-3、-2)位におけるTTからAA
pWISE 2963	tagRNA 176	LbCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	CTGGGGCCGTAACCCTCACTCCTGC TCGGTGAATTTGGCTCAGCAGGCA CCTGCCTCAGCTGCTCACTTGAGCC TCTGGGTCTA	(-3、-2)位におけるTTからAA
pWISE 4673	tagRNA 177	LbCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	ACAGCAGGCCTTTGGTCAGGTTGG CTGCTGGGCTGGCCCTGGGGCCGT TTCCCTCACTCCTGGACGGTGAATT TGGCTCAGCAGGCACCTGCCTCAG CTGCTCACTTGAGCCTCTGGGTCTA	(12、13)位におけるCTからGA
pWISE 4674	tagRNA 178	LbCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	ACAGCAGGCCTTTGGTCAGGTTGG CTGCTGGGCTGGCCCTGGGGCCGT TTCCCTCACTCCTGCTGCGTGAATT TGGCTCAGCAGGCACCTGCCTCAG CTGCTCACTTGAGCCTCTGGGTCTA	(14、15)位におけるCGからGC
pWISE 4735	tagRNA 179	LbCas12a	GCGGATG TTCCAATC AGTACGC A	AATAGCATTGCAGAGAGGCGTATCA TTTCGCGGATGTTGGAATCAGTACG CAGAGAGTCGCCGTCTCCAAGGTG AAAGCGGAAGTAGGGCCTTCGCGC AC	(10、11)位におけるCCからGG
pWISE 4736	tagRNA 180	LbCas12a	GCGGATG TTCCAATC AGTACGC A	AATAGCATTGCAGAGAGGCGTATCA TTTCGCGGATGTTCCTTTCAGTACG CAGAGAGTCGCCGTCTCCAAGGTG AAAGCGGAAGTAGGGCCTTCGCGC AC	(12、13)位におけるAAからTT
pWISE 4906	tagRNA 181	AsCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	ACAGCAGGCCTTTGGTCAGGTTGG CTGCTGGGCTGGCCCTGGGGCCGT AACCCTCACTCCTGCTCGGTGAATT TGGCTCAGCAGGCACCTGCCTCAG CTGCTCACTTGAGCCTCTGGGTCTA	(-3、-2)位におけるTTからAA
pWISE 4907	tagRNA 182	AsCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	GGCTGCTGGGCTGGCCCTGGGGCC GTAACCCTCACTCCTGCTCGGTGAA TTTGGCTCAGCAGGCACCTGCCTC	(-3、-2)位におけるTTからAA

				AGCTGCTCACTTGAGCCTCTGGGTC TA	
pWISE 4908	tagRNA 11 183	AsCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	GGCTGGCCCTGGGGCCGTAACCCT CACTCCTGCTCGGTGAATTTGGCTC AGCAGGCACCTGCCTCAGCTGCTC ACTTGAGCCTCTGGGTCTA	(-3、-2)位におけるTTからAA
pWISE 4909	tagRNA 12 184	AsCas12a	CCTCACTC CTGCTCG GTGAATTT	CTGGGGCCGTAACCCTCACTCCTGC TCGGTGAATTTGGCTCAGCAGGCA CCTGCCTCAGCTGCTCACTTGAGCC TCTGGGTCTA	(-3、-2)位におけるTTからAA
pWISE 4438	tagRNA 13 185	LbCas12a	CTGATGGT CCATGTCT GTTACTC	GCACTCTGCCACTTATTGGGTCAGC TGTTAACATCAGTACGTTAATGTAAC CTGATGGTCCATGTCTGTTACTCGC CTGTCAAGTGGCGTGACACCGGGC GTGTTCCCCAGAGTGACTTTTC	(-3、-2)位におけるTTからAA
pWISE 4439	tagRNA 14 186	LbCas12a	CTGATGGT CCATGTCT GTTACTC	AGCTGTTAACATCAGTACGTTAATG TAACCTGATGGTCCATGTCTGTTACT CGCCTGTCAAGTGGCGTGACACCG GGCGTGTTCCCCAGAGTGACTTTTC	(-3、-2)位におけるTTからAA

【０２５８】

ＤＭＮＴ１部位における精密な編集の活性に対するエキソヌクレアーゼトランスフェクションの効果を図１５に示す（エキソヌクレアーゼ処理なしに対して正規化；ｐＵＣ１９＝１）。エキソヌクレアーゼは、いくつかのガイド構成で編集を向上させる。

【０２５９】

［実施例３］

ＲＥＤＲＡＷタンパク質アーキテクチャにおけるバリエーション

本発明の方法（すなわち、ＲＥＤＲＡＷ）は、（１）逆転写酵素（ＲＴ（５Ｍ））が細胞内でＲＴを過剰発現させることによって提供されること；（２）ＳｕｎＴａｇ（ＧＣＮ４、例えば、配列番号２３、配列番号２４）がＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳエフェクタータンパク質（例えば、ＬｂＣｐｆ１）に融合されており、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されたＳｕｎＴａｇに結合する抗体（例えば、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）抗体）にそれを融合させることにより、編集部位へＲＴ（ＲＴ（５Ｍ））が動員される構築体；ならびに（３）逆転写酵素（ＲＴ（５Ｍ））がＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（例えば、ＬｂＣｐｆ１（ＬｂＣａｓ１２ａ））、例えば、ＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ））のＮ末端またはＣ末端に融合されていること（例えば、ＲＴ（５Ｍ）－ＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ）またはＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ）－ＲＴ（５Ｍ））を含むＬｂＣａｓ１２ａおよびＲＴ（５Ｍ）の異なるタンパク質アーキテクチャ／構築体を用いて試験された。図１６に結果が示されている。４つの異なるｔａｇＲＮＡ構築体を使用して、全ての構築体がＲＴ（５Ｍ）およびｔａｇＲＮＡに依存的なＲＥＤＲＡＷ活性の証拠を示した。この例では、ＳｕｎＴａｇによる積極的な動員は活性を増強しなかった。タグのない構築体の過剰発現は、十分なレベルの細胞内のタンパク質濃度を可能とし、それゆえ、これらの条件下では、精密な編集を生成するための律速的な状況とはならないのかもしれない。

【０２６０】

ＭＳ２／ＭＣＰ系

上記で試験したアーキテクチャに加えて、ＭＳ２／ＭＣＰ系も本発明の構築体および方法で使用するために評価した。ＭＳ２ヘアピンＲＮＡ構造は、ＭＣＰタンパク質に結合する。ＭＳ２ヘアピンはｔａｇＲＮＡに付加され得る。この例では、ＲＴ（５Ｍ）を標的部位に動員するために、ｔａｇＲＮＡの３’末端にＭＳ２ヘアピン構造を追加し、ＭＣＰを

ＲＴ（５Ｍ）に融合させた。
【０２６１】
ＲＴ（５Ｍ）を有するＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９ＡをＭＣＰなしで（トランスの対照）、またはＭＣＰ－ＲＴ（５Ｍ）（融合構築体）と共に一過性に発現させた。このアーキテクチャは、２つのｔａｇＲＮＡ、ｔａｇＲＮＡ５およびｔａｇＲＮＡ６を使用して試験した。我々はまた、ｔａｇＲＮＡ５とｔａｇＲＮＡ６の３’末端がＭＳ２配列で修飾された、異なるｔａｇＲＮＡバージョンも比較した。図３７に結果が示されている。ＭＣＰ－ＲＴ（５Ｍ）とＲＴ（５Ｍ）を比較すると、ＭＳ２　ｔａｇＲＮＡとＭＣＰ－ＲＴ（５Ｍ）では精密編集の効率は向上していなかった。これらの実験条件下ではＲＴ濃度が律速にならないため、ＭＣＰ融合物は、精密編集の効率を高めないのかもしれない。しかしながら、３’末端にＭＳ２を有するｔａｇＲＮＡでは、編集効率の上昇が認められた。ｔａｇＲＮＡの３’末端にあるＭＳ２構造は、ｔａｇＲＮＡを安定化し、その分解を低減し得る。
【０２６２】
［実施例４］
本発明の方法（ＲＥＤＲＡＷ）で使用するための５’－３’エキソヌクレアーゼ
５’－３’エキソヌクレアーゼは、二本鎖切断の両端でＤＮＡを分解することにより、本発明の方法で有用となり得る。したがって、５’－３’エキソヌクレアーゼは、（１）伸長するＤＮＡ鎖と通常塩基対になる鎖を分解することにより、より強固なＲＮＡ－ＤＮＡ二重鎖形成（ＲＴ媒介重合の基質）を可能にし、および／または（２）ＲＴによって上書きされる領域を分解することにより、細胞がＤＮＡ修復に使用するためにＲＴにより合成されたＤＮＡの使用を優先するようにできる。例えば、図１７の模式図を参照。
【０２６３】
この例で試験したエキソヌクレアーゼは、表１１に記載されているものを含む。
【０２６４】
【表１２】
表**12.** 試験した5'-3'エキソヌクレアーゼ

名称	フルネーム	供給源の種	配列番号
RecE	RecE	大腸菌	129
RecJ	RecJ	大腸菌	130
T5_Exo	T5ファージ由来エキソヌクレアーゼ	T5ファージ	131
T7_Exo	T7ファージ由来エキソヌクレアーゼ	T7ファージ	132
Lambda_Exo	ラムダファージ由来エキソヌクレアーゼ	ラムダファージ	133
sbcB	エキソデオキシリボヌクレアーゼI	大腸菌	134
hExo1	ヒトエキソヌクレアーゼ1	ヒト	135

【０２６５】
５’－３’エキソヌクレアーゼは、ＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）のＣ末端に融合された。融合構築体を、逆転写酵素（５Ｍ）構築体および精密な変異をコードする適切なｔａｇＲＮＡを発現するプラスミドと共にＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの３日後に細胞を回収し、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）を使用してＤＮＡを分析した。図１８に結果が示されている。ここではＲＴはトランスで発現され（動員なし）、５’－３’エキソヌクレアーゼはＬｂＣｐｆ１　Ｈ７５９ＡのＣ末端に融

合されている。エキソヌクレアーゼが存在しない構築体（ＬｂＣｐｆ１　Ｈ７５９Ａのみ）と比較して、特にＴ７＿Ｅｘｏの融合により、試験した４つのｔａｇＲＮＡのうち３つにおいてＲＥＤＲＡＷの精密な編集が向上する。

【０２６６】

図１９は、上記と同じ条件下で本発明の方法（ＲＥＤＲＡＷ）を使用した追加の５’－３’エキソヌクレアーゼ試験を提供している。具体的には、図１９は、Ｃａｓポリペプチド（ＬｂＣｐｆ１）のＣ末端にそれぞれ融合した５’－３’エキソヌクレアーゼｓｂｃＢ（配列番号１３４）または５’－３’エキソヌクレアーゼＥｘｏ（配列番号１３５）のいずれかを用いたＲＥＤＲＡＷによる精密編集の割合を示している。ＲＴ（５Ｍ）（配列番号９７）はトランスで発現される（動員なし）。Ｔ７＿Ｅｘｏ（配列番号１３２）とは対照的に、エキソヌクレアーゼｓｂｃＢおよびＥｘｏはＲＥＤＲＡＷを改善しなかった。

【０２６７】

５’－３’エキソヌクレアーゼはまた、本発明の方法を用いてトランスでも試験された。その結果を図２０に示す。ＬｂＣｐｆ１およびＲＴ（５Ｍ）（配列番号９７）は、融合タンパク質として提供される。図２０の右側は、ＬｂＣｐｆ１のＮ末端にＲＴを融合させた結果（ＲＴ（５Ｍ）－ＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ））を示し、図の左側は、ＬｂＣｐｆ１のＣ末端にＲＴを融合した結果（ＬｂＣｐｆ１（Ｈ７５９Ａ）－ＲＴ（５Ｍ））を示している。図２０は、ＬｂＣｐｆ１と融合させずに５’－３’エキソヌクレアーゼをトランスで発現させた場合、５’－３’エキソヌクレアーゼなしの処理と比較して、編集率は上昇しないことを示している。したがって、本発明の方法での５’－３’エキソヌクレアーゼの使用による利益は、５’－３’エキソヌクレアーゼがＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質に融合されている場合に観察される。

【０２６８】

［実施例５］

ＲＥＤＲＡＷで使用するＣａｓ１２ａのＤＮＡ結合親和性を調節する変異

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質のＤＮＡ結合親和性を低下させることで、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が標的部位からより適切に解離することが可能となり、それによって二本鎖ＤＮＡ切断が誘導されることが想定された。これにより、ＲＴによる配列置換を促進する中間体のより迅速な形成が可能となり、本発明の方法（ＲＥＤＲＡＷ）による編集の効率が向上し得る。

【０２６９】

この例では、ＤＮＡ骨格と相互作用するＣａｓ１２ａ（ＬｂＣａｓ１２ａ）内の正に荷電した残基をアラニンに変異させた。具体的には、以下の３つの変異、Ｋ１６７Ａ、Ｋ２７２Ａ、Ｋ３４９Ａ（配列番号１または配列番号１４８のアミノ酸位置番号付けを参照）を単一、二重または三重変異体（Ｋ１６７Ａ、Ｋ２７２Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ１６７Ａ＋Ｋ２７２Ａ、Ｋ１６７Ａ＋Ｋ３４９Ａ、Ｋ２７２Ａ＋Ｋ３４９Ａ、およびＫ１６７Ａ＋Ｋ２７２Ａ＋Ｋ３４９Ａ）としてＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａ中にクローニングした。この場合、Ｈ７５９Ａ変異（配列番号１４８）を使用して、ＬｂＣａｓ１２ａのＲＮＡプロセシング能力を不活化し、ｃｒＲＮＡへの５’ｔａｇＲＮＡの伸長を容易にした。

【０２７０】

結合親和性変異の様々な組合せを含むＬｂＣａｓ１２ａを、ＲＴ（５Ｍ）をコードするプラスミドおよび精密な編集をコードするｔａｇＲＮＡと共にＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの３日後に細胞を回収し、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）を使用してＤＮＡを分析した。特定の変異の組合せは、本発明の方法の精密編集を改善することが示された（図２１）。

【０２７１】

［実施例６］

ＲＥＤＲＡＷで使用する一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ｓｓＤＮＡ　ＢＰ）

一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ｓｓＤＮＡ　ＢＰ）の使用は、反応中に生成されるｓｓＤＮＡを安定化させ、ＤＮＡ鎖を分解から保護し、ＲＴを介したプライミングおよび重合

にそれを利用できるようにすることによって、潜在的にＲＥＤＲＡＷを改善し得る。選択したｓｓＤＮＡ　ＢＰを本発明の方法で試験した（表１２参照）。

【０２７２】

【表１３】

表13. 評価した一本鎖DNA結合タンパク質

名称	供給源の種	配列番号
hRad51(S208E_A209D)	ヒト	123
hRad52	ヒト	124
BsRecA	枯草菌	125
EcRecA	大腸菌	126
T4SSB	エシェリヒアファージP1	127
Brex27	ヒト	128

【０２７３】

表１２に記載のｓｓＤＮＡ　ＢＰをトランスで、またはＣａｓ１２ａとの融合体として、ＲＴ（５Ｍ）（トランス）も存在する中で発現させた。試験したｓｓＤＮＡ　ＢＰは、ｈＲａｄ５１＿ｓ２０８Ｅ＿Ａ２０９Ｄ（配列番号１２３）、ｈＲａｄ５２（配列番号１２４）、ＢｓＲｅｃＡ（配列番号１２５）、ＥｃＲｅｃＡ（配列番号１２６）、Ｔ４ＳＳＢ（配列番号１２７）およびＢｒｅｘ２７（配列番号１２４）であった。その結果を図２２および図２３に示す。ｓｓＤＮＡ　ＢＰをトランス発現させても、対照（ｐＵＣ１９）と比較して、精密編集の割合は向上しなかった（図２２参照）。また、融合タンパク質も、Ｂｒｅｘ２７とＣａｓ１２のＮ末端およびＣ末端の融合を除いて、改善を示すことはできなかった（図２３参照）。Ｂｒｅｘ２７は、ｉｎ　ｓｉｔｕでＲａｄ５１を動員し、ｓｓＤＮＡとの相互作用を安定化させることが知られているペプチドである。

【０２７４】

［実施例７］

ＲＥＤＲＡＷで使用するためのＧａｍタンパク質の評価

Ｇａｍタンパク質は、ＮＨＥＪを防ぐことで、ＲＥＤＲＡＷ中のインデルの形成を低減するのに役立ち得る。Ｇａｍは、二本鎖ＤＮＡ切断部分に結合し、ＤＮＡ末端のプロセシングを防ぐ。Ｇａｍは、シトシン塩基編集の際のインデル形成を低減するために使用され得る。

【０２７５】

本発明の方法でのＧａｍタンパク質の有用性を評価するために、Ｇａｍタンパク質（エシェリヒアファージＭｕ　Ｇａｍタンパク質）（配列番号１４７）を、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質（ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａ）（配列番号１４８）またはＲＴ（５Ｍ）（配列番号５３）のいずれかに融合させた。ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａ、ＲＴ（５Ｍ）、および精密な変異をコードするｔａｇＲＮＡをコードするプラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした。３日後にハイスループット配列決定を使用して標的ＤＮＡを分析した。その結果を図２４および図２５に示す。

【０２７６】

図２４において、逆転写酵素（ＲＴ）は、ネイティブ配列（例えば、ＲＴ（５Ｍ））またはそのＮ末端でＧａｍタンパク質と融合したもの（例えば、Ｇａｍ－ＲＴ（５Ｍ））のいずれかとして、トランスで発現されている。これらの構築体は、ＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）またはそのＮ末端に融合したＧａｍタンパク質を有するＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）（例えば、Ｇａｍ－ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａ）と同時に発現される。図２５では、Ｇａｍタンパク質は、逆転写酵素との融合タンパク質（Ｎ末端融合；Ｇａｍ－ＲＴ（５Ｍ））および／またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクターポリペプチドとの融合タンパク質（例えば、Ｇａｍ－ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａ）として、トランスで提供

されている。結果は、場合によっては、インデル形成を低減させるためにＧａｍタンパク質を使用できるが、本発明の方法を使用する編集の全体的な効率は、Ｇａｍタンパク質を含めることによって改善されないことを示している。

【０２７７】

［実施例８］

プライマー結合部位（ＰＢＳ）の長さと逆転写酵素鋳型（ＲＴＴ）の長さの評価

本発明のｔａｇＲＮＡにおけるＲＴＴおよびＰＢＳの長さを変化させて、編集に対する長さの影響を評価した。様々な長さのＲＴＴおよびＰＢＳを有するＬｂＣａｓ１２ａ、ＲＴ（５Ｍ）、およびｔａｇＲＮＡをＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトし、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）を用いて、トランスフェクションの３日後の編集率を分析した。その結果を図２６に示す。図２６の上および下のパネルは、２つの異なるスペーサー（上のパネル：ｐｗｓｐ１４３（ＧＣＴＣＡＧＣＡＧＧＣＡＣＣＴＧＣＣＴＣＡＧＣ）（配列番号１３６）、下のパネル：ｐｗｓｐ１３９（ＣＴＧＡＴＧＧＴＣＣＡＴＧＴＣＴＧＴＴＡＣＴＣ）（配列番号１３７）を用いた結果を示している。結果は、使用したスペーサーによって異なるが、ＲＴＴとＰＢＳの両方で多くの異なる長さが良好な編集効率を示した。ＰＢＳの長さとＲＴＴの長さを組み合わせた１つの最適なものは、それぞれ４８ヌクレオチドと５２ヌクレオチドであり得る。

【０２７８】

［実施例９］

ｔａｇＲＮＡ内における編集部の配置の評価

ＲＥＤＲＡＷの効率は、ｔａｇＲＮＡの逆転写酵素鋳型（ＲＴＴ）内のどこに所望の編集部が位置するかに応じて変動し得る。この例では、ＲＴＴ内の編集位置が編集の割合に及ぼす効果を評価した。図２７では、編集部の位置と結果が太字で示されている。上と下のパネルは、編集位置が変更された異なるＲＴＴ配列を提供している（上のパネルのＲＴＴ：配列番号１８７；下のパネルのＲＴＴ：配列番号１８８）。図２７の上のパネルと下のパネルの両方にある「編集位置」の列は、ＲＴＴの最初の２６塩基の逆相補配列を示しており、これは、ＰＡＭ配列（ＴＴＴＣ）および２３塩基のスペーサー配列に対応している。我々は、所望の編集がＤＮＡに導入されると、ＲＥＤＲＡＷに使用したスペーサーが相補的でなくなるように、ＲＴＴに沿って二重変異を並べた。ＲＴＴ内の多くの位置に編集部を配置し、編集が効果的であるかを判断した。いくつかの例において、ＲＴＴ配列中のヌクレオチド１２～１５に対応する位置（ＬｂＣａｓ１２ａのＴＴＴＮ　ＰＡＭはそれぞれ位置－４、－３、－２、－１として定義）に編集部を置くと、非常に高いレベルの編集がもたらされた。

【０２７９】

［実施例１０］

異なるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質を使用したＲＥＤＲＡＷ編集

ＲＥＤＲＡＷは、二本鎖ＤＮＡ切断を生成できる代替的なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質と互換性があると想定された。この例では、ＬｂＣａｓ１２ａとｃａｓ９（ＳｐＣａｓ９）、ＢｈＣａｓ１２ｂ、ＡｓＣａｓ１２ａ（ＥｎＡｓＣａｓ１２ａ）が、代替的なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質が本発明の方法（ＲＥＤＲＡＷ）でうまく使用できることを示している。

【０２８０】

Ｃａｓ９

ＲＴ（５Ｍ）、精密編集をコードするｔａｇＲＮＡ、および２つの形態のＣａｓ９（Ｃａｓ９（ヌクレアーゼ）、ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）（ニッカーゼ））を用いてＨＥＫ２９３Ｔ細胞を形質転換し、発現させた。トランスフェクションの３日後に細胞を採取し、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）を用いて標的アンプリコンを配列決定した。ＰＢＳとＲＴＴの長さを変え、ガイドＲＮＡの３’末端と５’末端の両方に拡張部が追加した（図２８では「３’拡張」または「５’拡張」と表記）。使用したｔａｇＲＮＡ拡張部は、４つの異なる標的部位（スペーサー：ｐｗｓｐ１０：ＧＡＧＴＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡ

Ａ（配列番号１４０）；ｐｗｓｐ６２１：ＧＣＡＴＴＴＣＡＧＧＡＧＧＡＡＧＣＧＡ（配列番号１４１）；ｐｗｓｐ１５：ＧＴＣＡＴＣＴＴＡＧＴＣＡＴＴＡＣＣＴＧ（配列番号１４２）；ｐｗｓｐ１１：ＧＧＡＡＴＣＣＣＴＴＣＴＧＣＡＧＣＡＣＣ（配列番号１４３））を標的化した。その結果を図２８に示す。Ｃａｓ９とｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）の両方を用いて、複数の異なるスペーサー配列を使用し、ＲＴを介した精密な編集が観察されたが、ヌクレアーゼバージョンの性能が最も優れていた。さらに、ＲＥＤＲＡＷでは３’および５’ｔａｇＲＮＡ拡張の両方が効果的であったが、拡張ガイドＲＮＡの３’拡張の性能が最も優れていた。

【０２８１】

ＢｈＣａｓ１２ｂ

ＲＴ（５Ｍ）、精密編集をコードするｔａｇＲＮＡ、およびＢｈＣａｓ１２ｂ　ｖ４（ＢｈＣａｓ１２ｂの高効率バージョンを操作したもの）を用いてＨＥＫ２９３Ｔ細胞を形質転換し、発現させた。トランスフェクションの３日後に細胞を採取し、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）を用いて標的アンプリコンを配列決定した。ＰＢＳとＲＴＴの長さを変え、ガイドＲＮＡの３’末端と５’末端の両方に拡張部を追加した（図２９では３’、５’と表記）。使用したｔａｇＲＮＡ拡張部は、３つの異なる標的部位（スペーサー：ＰＷｓｐ１０９９：ＡＣＧＴＡＣＴＧＡＴＧＴＴＡＡＣＡＧＣＴＧＡ（配列番号１４４）；ＰＷｓｐ１０９８：ＧＧＴＣＡＧＣＴＧＴＴＡＡＣＡＴＣＡＧＴＡＣ（配列番号１４５）；ＰＷｓｐ１０９４：ＴＣＣＡＧＣＣＣＧＣＴＧＧＣＣＣＴＧＴＡＡＡ（配列番号１４６））を標的化するものであった。その結果を図２９に示す。ＢｈＣａｓ１２ｂ　ｖ４および複数の異なるスペーサー配列を使用して、ＲＴを介した精密な編集が観察された。ＢｈＬｂＣａｓ１２ｂを使用した場合、ＲＴＴとＰＢＳの長さの特定の組合せが、他の組合せよりも高い編集を生じさせた。一般に、ＢｈＬｂＣａｓ１２ｂを使用した場合、ｔａｇＲＮＡの３’拡張は５’拡張よりも一貫した編集をもたらしたが、両方の形態のｔａｇＲＮＡを使用して編集が検出された。

【０２８２】

ＥｎＡｓＣａｓ１２ａ

ＡｓＣａｓ１２ａはＬｂＣａｓ１２ａのホモログであり、ＥｎＡｓＣａｓ１２ａはＡｓＣａｓ１２ａの操作されたバージョンである。ＥｎＡｓＣａｓ１２ａにおけるＨ８００Ａ変異は、ＬｂＣａｓ１２ａのＨ７５９Ａ変異に対応しており、これはＣａｓ１２ａのｃｒＲＮＡプロセシング能力を不活化する変異である。

【０２８３】

ＲＴ（５Ｍ）、精密編集をコードするｔａｇＲＮＡ、ＥｎＡｓＣａｓ１２ａ　Ｈ８００Ａ（ＥｎＡｓＣｐｆ１　Ｈ８００Ａ）を用いてＨＥＫ２９３Ｔ細胞を形質転換し、発現させた。この例では、逆転写酵素は、ＥｎＡｓＣａｓ１２ａとの融合タンパク質（Ｃ末端融合体（ＥｎＡｓＣａｓ１２ａ－ＲＴ）およびＮ末端融合体（ＲＴ－ＥｎＡｓＣａｓ１２ａ））として提供された。トランスフェクションの３日後に細胞を採取し、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）を用いて標的アンプリコンを配列決定した。複数の異なるｔａｇＲＮＡ配列を使用してＥｎＡｓＣａｓ１２ａを使用すると、精密なＲＴ依存的およびｔａｇＲＮＡ依存的編集が観察された。使用したｔａｇＲＮＡ拡張部は、単一の部位を標的化した（スペーサー：ＣＣＴＣＡＣＴＣＣＴＧＣＴＣＧＧＴＧＡＡＴＴＴ（配列番号１７１））。

【０２８４】

その結果を図３０に示すが、これは、様々なｔａｇＲＮＡの存在下で、ＲＴとＥｎＡｓＣａｓ１２ａのＮ末端およびＣ末端の融合体は、いずれも精密な編集をもたらすことを示している。ＲＴが融合していないＥｎＡｓＣａｓ１２ａを対照として使用すると、編集が起こらない、または非常に低くなることが示された。

【０２８５】

［実施例１１］

酵母における編集

本発明の方法を用いてヒトの細胞を編集できることを示すことに加えて、真核生物である出芽酵母（酵母）においても同様に評価した。出芽酵母は、例えば、（１）出芽酵母はＮＨＥＪ修復プロセスを利用する；ゲノムの二本鎖切断は、しばしば定向進化実験に用いられる原核生物（例えば、大腸菌）と違って致死的でない；（２）酵母は比較的早く増殖するため、本発明の方法（ＲＥＤＲＡＷ）について条件の多くを迅速に試験し、調整することができる；（３）何千もの酵母株が容易に入手できる；（４）生体分子（タンパク質、ＲＮＡなど）の大きなライブラリが酵母で調査できる、といったいくつかの理由から、本発明の方法を評価するための魅力的な生物である。

【０２８６】

本実施例では、出芽酵母株Ｗ３０３－１ａ（以下、「ＳｃＷ３０３－１ａ」という）を選択した。ＳｃＷ３０３－１ａの遺伝子型は、ＭＡＴａ　ａｄｅ２－１　ｕｒａ３－１　ｈｉｓ３－１１　ｔｒｐ１－１　ｌｅｕ２－３　ｌｅｕ２－１１２　ｃａｎ１－１００である。この株の編集標的には、ＡＤＥ２、ＣＡＮ１、ＨＩＳ３、ＬＹＳ２、ＴＲＰ１、およびＵＲＡ３が含まれる。サンガー配列決定を使用して、各ＰＣＲ産物の遺伝子座配列を確認した。配列決定された全ての遺伝子座は、ＡＤＥ２を除き、予想どおりであった。ＡＤＥ２遺伝子座は、Ｇｌｎ６４にストップコドンがあると予想されていた；しかしながら、配列決定は、Ｇｌｎ６４にストップコドンの代わりにチロシンコドンが存在することを示した。その結果、ＡＤＥ２遺伝子座を修飾した特製の株を構築し、その遺伝子座でＲＥＤＲＡＷを試験した。修飾株はＳｃＤＳ２１．６と命名された。表１３は、酵母での試験のために選択されたゲノム標的を提供している。

【０２８７】

【表１４】

表**14.** REDRAW編集の酵母ゲノム標的。

株 (標的)	変異	栄養要求性	追加の表現型	コメント
ScDS21.6 (*ADE2*)	アミノ酸156 GGA -> TAA	アデニン	赤いコロニー	社内で生成(*ADE2-1* 変異と同じ効果)
W303-1a (*ura3-1*)	アミノ酸234 GGA -> GAA	ウラシル	5-FOA耐性	Li et al.未公表

【０２８８】

これらの部位を標的化するための例示的なスペーサーは以下を含む：

ＰＷｓｐ１６４３（ＡＤＥ２標的）：５’－ＧＣＡＴＡＣＧＡＴＧＧＡＡＧＡＧＧＴＡＡＣＴＴ－３’（配列番号１５９）

ＰＷｓｐ１８９４（ＡＤＥ２標的）：５’－ＧＣＡＴＡＣＧＡＴＴＡＡＡＧＡＧＧＴＡＡＣＴＴ－３’（配列番号１６０）

ＰＷｓｐ１６６５（ＵＲＡ３－１標的）：５’－ＣＡＡＡＴＡＧＴＣＣＴＣＴＴＴＣＡＡＣＡＡＴＡ－３’（配列番号１６１）

プライマー結合部位配列の例：

４８ｂｐプライマー結合部位　ＡＤＥ２　標的：

５’－ＣＧＴＴＧＴＡＡＡＧＡＡＴＡＡＧＧＡＡＡＴＧＡＴＴＣＣＧＧＡＡＧＣＴＴＴＧＧＡＡＧＴＡＣＴＧＡＡ－３’（配列番号１６２）

４８ｂｐプライマー結合部位　ＵＲＡ３－１　標的：

５’－ＡＴＡＡＴＧＴＣＡＧＡＴＣＣＴＧＴＡＧＡＧＡＣＣＡＣＡＴＣＡＴＣＣＡＣＧＧＴＴＣＴＡＴＡＣＴＧＴ－３’（配列番号１６３）

逆転写酵素鋳型配列の例：

（Ａ）ＡＤＥ２　標的：

４０－ｂｐ　ＲＴＴ：５’－ＴＧＡＡＧＴＣＧＡＧＧＡＣＴＴＴＧＧＣＡＴＡＣＧＡＴＧＧＡＡＧＡＧＧＴＡＡＣＴＴ－３’（配列番号１６４）
５０－ｂｐ　ＲＴＴ：５’－ＣＣＡＴＴＣＧＴＣＴＴＧＡＡＧＴＣＧＡＧＧＡＣＴＴＴＧＧＣＡＴＡＣＧＡＴＧＧＡＡＧＡＧＧＴＡＡＣＴＴ－３’（配列番号１６５）
７２－ｂｐ　ＲＴＴ：５’－ＴＧＴＴＧＧＡＡＧＡＧＡＴＴＴＧＧＧＴＴＴＴＣＣＡＴＴＣＧＴＣＴＴＧＡＡＧＴＣＧＡＧＧＡＣＴＴＴＧＧＣＡＴＡＣＧＡＴＧＧＡＡＧＡＧＧＴＡＡＣＴＴ－３’（配列番号１６６）
（Ｂ）　ＵＲＡ３－１標的
４７－ｂｐ　ＲＴＴ：５’－ＣＴＡＣＣＴＴＡＧＣＡＴＣＣＣＴＴＣＣＣＴＴＴＧＣＡＡＡＴＡＧＴＣＣＴＣＴＣＡＡＣＡＡＴＡ－３’（配列番号１６７）
５５－ｂｐ　ＲＴＴ：５’－ＴＴＣＡＣＣＣＴＣＴＡＣＣＴＴＡＧＣＡＴＣＣＣＴＴＣＣＣＴＴＴＧＣＡＡＡＴＡＧＴＣＣＴＣＴＣＴＣＡＡＣＡＡＴＡ－３’（配列番号１６８）
６３－ｂｐ　ＲＴＴ：５’－ＣＴＧＴＡＡＣＧＴＴＣＡＣＣＣＴＣＴＡＣＣＴＴＡＧＣＡＴＣＣＣＴＴＣＣＣＴＴＴＧＣＡＡＡＴＡＧＴＣＣＴＣＴＣＴＣＡＡＣＡＡＴＡ－３’（配列番号１６９）
ＬｂＣａｓ１２ａ　ｃｒＲＮＡスキャフォールドの例：
５’－ＴＡＡＴＴＴＣＴＡＣＴＡＡＧＴＧＴＡＧＡＴ－３’（配列番号１７０）
【０２８９】
　タンパク質発現ベクターｐＥＳＣ－ＬＥＵは、（１）ＳｃＷ３０３－１ａ株に適合する酵母選択マーカーＬＥＵ２を含むこと、（２）プラスミド中のＧＡＬプロモーター系によりタンパク質発現を強力に制御できること、（３）酵母複製起点２μが高コピーであるため高レベルでのタンパク質発現が可能であること、（４）大腸菌の複製起点（ｐＵＣ起点）と選択マーカーであるＡｍｐＲも存在するため、酵母での作業前に大腸菌で全てのベクター操作とクローニングが可能であることを理由として、使用された。
【０２９０】
　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエフェクタータンパク質と逆転写酵素の構成は以下のものを使用した：
・ＬｂＣａｓ１２ａ＋Ｃ末端融合ＭＭＬＶ－ＲＴ（５Ｍ）（配列番号１５５）
・ＬｂＣａｓ１２ａ＋Ｎ末端融合ＭＭＬＶ－ＲＴ（５Ｍ）（配列番号１５７）
ＬｂＣａｓ１２ａ融合体は、誘導性ＧＡＬ１プロモーター（ｐｏｌ　ＩＩプロモーター）の制御下に置き、ｃｒＲＮＡとｔａｇＲＮＡは、構成的なＳＮＲ５２プロモーター（ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター）から発現させた。
【０２９１】
　さらに、以下のｔａｇＲＮＡ構成を、２つのＬｂＣａｓ１２ａおよびＲＴ構成で試験した：（１）３’シュードノットの不在、（２）（ａ）「デコイ」シュードノットと呼ばれるシュードノット（図７、配列番号２０３を参照）または（ｂ）ｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットと呼ばれるシュードノット（配列番号１５８）のいずれかのシュードノットの存在。さらに、３つの異なる逆転写酵素鋳型（ＲＴＴ）の長さ（４７、５５、６４ヌクレオチド、または４０、５０、７２ヌクレオチド）を、４８ヌクレオチドの固定長を持つプライマー結合部位（ＰＢＳ）を用いて、それぞれ試験した。これらの構成は、表１５に示すとおりである。
【０２９２】

【表１５】

表15. 酵母で試験した例示的なREDRAWの構成

pWISE	標的	PBS	RTT	REDRAW エディタ	3'シュードノット
5584 5585 5586	*URA3-1*	48-bp	47-bp 55-bp 63-bp	C末端RT	なし
5890 5591 5592	*URA3-1*	48-bp	47-bp 55-bp 63-bp	N末端RT	なし
5853 5854 5855 5856 5857 5858	*URA3-1*	48-bp	47-bp 55-bp 63-bp 47-bp 55-bp 63-bp	C末端RT	デコイシュードノット デコイシュードノット デコイシュードノット tEvoPreQ1 tEvoPreQ1 tEvoPreQ1
5865 5866 5867 5868 5869 5870	*URA3-1*	48-bp	47-bp 55-bp 63-bp 47-bp 55-bp 63-bp	N末端RT	デコイシュードノット デコイシュードノット デコイシュードノット tEvoPreQ1 tEvoPreQ1 tEvoPreQ1
5581 5582 5583	*ADE2*	48-bp	40-bp 50-bp 72-bp	C末端RT	なし
5587 5588 5589	*ADE2*	48-bp	40-bp 50-bp 72-bp	N末端RT	なし
5848 5849 5850 5851 5852	*ADE2*	48-bp	50-bp 72-bp 40-bp 50-bp 72-bp	C末端RT	
5860 5861 5862 5863 5864	*ADE2*	48-bp	50-bp 72-bp 40-bp 50-bp 72-bp	N末端RT	
5082(陰性対照)tagRNA なし	*ADE2* *URA3-1*	N/A	N/A	C末端融合RT	N/A
5083(陰性対照)tagRNA なし	*ADE2* *URA3-1*	N/A	N/A	N末端融合RT	N/A
5074 (切断対照)	*ADE2*	N/A	N/A	LbCas12a	N/A
5077 (切断対照)	*URA3-1*	N/A	N/A	LbCas12a	N/A

【０２９３】

ＲＥＤＲＡＷは、まず出芽酵母において、ＰＥＧ／ＬｉＡｃヒートショック法により、注目するベクターを用いて酵母株ＳｃＤＳ２１．６（ＡＤＥ２標的部位）または酵母株ＳｃＷ３０３－１ａ（ＵＲＡ３標的部位）のいずれかを形質転換することにより試験した。形質転換体を、ロイシンを欠き、炭素源として２％グルコースを含む合成完全培地（ＳＣ－ＬＥＵ＋２％Ｇｌｕ）上にプレーティングした。約４８～７２時間後、単一のコロニーを採取して、３ｍＬの液体ＳＣ－ＬＥＵ＋２％ラフィノース（ＳＣ－ＬＥＵ＋２％　Ｒａｆｆ）中に入れた。２００ｒｐｍで振盪しながら２８℃で約３６時間、OD_{600}が～１．８になるまで培養を行った。次に、１．５ＯＤの細胞を室温で遠心分離機によりスピン

ダウンし、３ｍＬのタンパク質発現培地、ＳＣ－ＬＥＵ＋１％ラフィノース＋１％ガラクトース（ＳＣ－ＬＥＵ＋１％　Ｒａｆｆ＋１％　Ｇａｌ）に戻した。発現培養物を２００ｒｐｍで振盪しながら２８℃で４時間培養した。次いで、発現培養物を振盪インキュベーターから取り出し、遠心分離した。次いで、上清をピペットで取り除き、３ｍＬのＳＣ－ＬＥＵ＋２％　Ｇｌｕを添加した。次いで、細胞を２８℃、２００ｒｐｍでさらに９０分間増殖させた。９０分後、培養物のＯＤ$_{600}$を確認した。各培養物の約１ＯＤの酵母細胞（約１×１０^{7}個の酵母細胞）を室温で遠心分離機においてペレット化した。上清を除去し、各培養物を２００ｕＬの滅菌水に再懸濁した。編集されたコロニーを選択するために、再懸濁した培養液（０．５ＯＤ）の約半分（約５×１０^{6}個の酵母細胞）をアデニン（ＳＣ－ＡＤＥ）またはウラシル（ＳＣ－ＵＲＡ）のいずれかを欠く合成完全プレート上にプレーティングし、残りの半分はＳＣ－ＬＥＵプレート上にプレーティングした（非選択的、約０．５の測定ＯＤ中にどれくらいの細胞があるかを見るため）。このプレートを２８℃で約３日間培養した。次いで、コロニーを数えて記録した。ＳＣ－ＡＤＥ／ＳＣ－ＵＲＡプレートまたはＳＣ－ＬＥＵ（陰性対照）プレートからコロニーを選択し、コロニーＰＣＲを用いて標的遺伝子座を増幅した。サンガー配列決定を用いて標的遺伝子座を解析した結果、意図された編集が行われたことが確認された（ＡＤＥ２における２－ｂｐの変更：ＡＡ１５６　ＴＡＡ－＞ＧＧＡおよびＵＲＡ３－１における１－ｂｐの変更：ＡＡ２３４　ＧＧＡ－＞ＧＡＡ）。

【０２９４】

ＬｂＣａｓ１２ａおよびＲＴの構成／ｔａｇＲＮＡの組合せのそれぞれを、酵母の２つの異なる標的部位で試験し、その結果を図３１と図３２に示す。図３１は、ＵＲＡ３－１標的遺伝子の編集の結果を示しており（ＵＲＡ３－１：１－ｂｐの変更（ＡＡ　２３４　ＧＧＡ－＞ＧＡＧ）（編集はアデニン栄養要求性を修復する））、上のパネルはＬｂＣａｓ１２－ＲＴ　Ｃ末端融合、下のパネルはＲＴ－ＬｂＣａｓ１２　Ｎ末端融合の結果を示している。図３２は、ＡＤＥ２標的遺伝子の編集の結果を示しており（ＡＤＥ２：２－ｂｐの変更（ＡＡ　１５６　ＴＡＡ－＞ＧＧＡ）（編集はウラシル栄養要求性を修復する））、上のパネルはＬｂＣａｓ１２－ＲＴ　Ｃ末端融合、下のパネルはＲＴ－ＬｂＣａｓ１２　Ｎ末端融合の結果を示している。全ての構成が、ＵＲＡ３－１遺伝子を編集して生存可能なコロニー（アデニン栄養要求性の修復）を生成できたが、最も効率的な構成は、シュードノットと５５ヌクレオチドの長さを持つＲＴＴを含むものであった（図３１）。ＲＴ、ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｃ末端融合は、「デコイ」シュードノットで最も効率がよく、ＲＴ、ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｎ末端融合は、ｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットで最も効率がよかった（図３１参照）。酵母のＡＤＥ２の編集は、ＲＴ、ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｃ末端融合は、「デコイ」シュードノットで最も効率がよく、ＲＴ、ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｎ末端融合は、ｔＥｖｏＰｒｅＱ１シュードノットで最も効率がよい、という同様の結果を示した（図３２）。ＡＤＥ２の場合、編集は５０ヌクレオチドの長さのＲＴＴで最も効率がよかった。

【０２９５】

したがって、この実施例は、本発明の方法がどちらの標的部位でも酵母を精密に編集できることを示しており、そして、これら２つの標的に対しては、Ｃ末端融合ＲＴ構成のいずれかのタンパク質融合構成を使用すると、Ｎ末端融合ＲＴ構成よりもわずかに効率が高くなることが示された。シュードノットは、試験した各構成において、ＲＥＤＲＡＷの編集効率を向上させることが確認された。さらに、ｔａｇＲＮＡおよびＲＥＤＲＡＷエディタが存在しない場合、選択プレート（ＳＣ－ＡＤＥまたはＳＣ－ＵＲＡ）では増殖が観察されず、酵母におけるこれらのＲＥＤＲＡＷアッセイは非常にストリンジェントであり、エスケープ頻度は検出限界以下であることが指し示された。

【０２９６】

［実施例１２］

編集におけるｓｓＲＮＡ結合タンパク質の評価

一本鎖ＲＮＡ結合タンパク質（ｓｓＲＮＡ　ＢＰ）は、リボ核酸と非特異的に相互作用

するタンパク質である。本発明の方法で編集する際にｓｓＲＮＡ結合タンパク質を発現させることで、露出したｔａｇＲＮＡ成分（拡張ガイド核酸）を内因性のタンパク質による分解に対して安定化させ得る。これを試験するために、いくつかのＲＮＡ結合タンパク質をＲＴ（５Ｍ）－ＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）のＮ末端に融合させて発現させた。

【０２９７】

ｓｓＲＮＡ結合タンパク質であるディフェンシン（配列番号１５２）およびＯＲＦ５（配列番号１５３）を用いた精密編集の結果を図３３に示す。ｓｓＲＮＡ　ＢＰのディフェンシンおよびｓｓＲＮＡ　ＢＰのＯＲＦ５をそれぞれ、ＲＴ－ＬｂＣａｓ１２融合タンパク質（例えば、ＲＴ－ＬｂＣａｓ１２ａ）のＮ末端に融合させた。編集は、そのＮ末端でｓｓＲＮＡ結合タンパク質と融合していない同じＲＴ－Ｃａｓ１２ａ融合タンパク質との比較で示されている。試験した２つのｔａｇＲＮＡ（拡張ガイド核酸）のうち１つについてｓｓＲＮＡ結合タンパク質を使用することで、精密編集が向上することが示された。

【０２９８】

［実施例１３］

異なる変異を有する逆転写酵素ポリペプチドの評価

逆転写酵素ＲＴ（５Ｍ）は、野生型ＲＴ配列に５つの変異を導入することによって操作された（Ａｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　５７６：１４９－１５７（２０１９））。ＲＴ（５Ｍ）と比較して異なる変異または追加の変異を有するＲＴドメインを用いることにより、本発明の方法をさらに最適化できるかどうかを評価するために、ＲＴ（５Ｍ）のコア変異を有するか有さないかの異なる変異および変異の組合せを有するいくつかの逆転写酵素（ＲＴ）タンパク質をＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）にＮ末端で融合させた。試験したＲＴドメインは、ＲＴ（Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｗ３８８Ｒ、Ｅ６０７Ｋ）、ＲＴ（Ｌ１３９Ｐ、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｗ３８８Ｒ、Ｅ６０７Ｋ）、ＲＴ（５Ｍ、Ｆ１５５Ｙ、Ｈ６３８Ｇ）、ＲＴ（５Ｍ、Ｑ２２１Ｒ、Ｖ２２３Ｍ）およびＲＴ（５Ｍ、Ｄ５２４Ｎ）を含んでいた。ＲＴ（Ｍ）の変異は、配列番号１７２のアミノ酸配列番号付けを参照して、Ｄ２００Ｎ＋Ｌ６０３Ｗ＋Ｔ３３０Ｐ＋Ｔ３０６Ｋ＋Ｗ３１３Ｆを含む（配列番号５３を参照）。ＲＴ（５Ｍ）変異を含まない配列のアミノ酸位置番号付けの参照ＲＴは、配列番号１７２である。ＲＴ（５Ｍ）変異を含む配列のアミノ酸位置番号付けの参照ＲＴは、配列番号５３である。いずれの場合も、ＲＴはＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）のＮ末端に融合された。

【０２９９】

図３４にその結果を示す。ＲＴ（５Ｍ）（左）と比較して、変異の組合せが異なる他のいくつかのＲＴドメインが、ＲＴ（５Ｍ）と比較して精密な編集を向上させることができた。この結果は、使用したｔａｇＲＮＡ（拡張ガイド核酸）の影響を受けている。

【０３００】

［実施例１４］

ｔａｇＲＮＡの３’末端に組み込まれた３’構造化ＲＮＡモチーフの評価

ｔａｇＲＮＡの３’末端に組み込んだ構造化ＲＮＡが、ｔａｇＲＮＡをさらに安定化させ、それを可能な分解から保護し得るかどうかを評価するための実験を行った。この目的のために、ヘアピンおよびシュードノットを含む３－Ｄ構造を形成することが知られているいくつかのＲＮＡ配列を異なるｔａｇＲＮＡに付加した。

【０３０１】

【表１６】

表16.転写されてtagRNAの3'末端に付加された場合のRNA構造に対応するDNA配列

AsCpf1BB	TAATTTCTACTCTTGTAGAT **配列番号189**
BoxB	GGGCCCTGAAGAAGGGCCC **配列番号190**
シュードノット(デコイ)	TAAGTCTCCATAGAATGGAGG **配列番号95**（**配列番号203も参照**）-
evopreQ1	TTGACGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACUAGAAA **配列番号191**
fmpknot	GGAGGTCAGGGTCAGGAGCCCCCCCCTGAACCCAGGATAACCCTCAAAGTCGGGGGGCAACCC **配列番号192**
mpknot	GGGTCAGGAGCCCCCCCCTGAACCCAGGATAACCCTCAAAGTCGGGGGGCAACCC **配列番号193**
MS2	GGCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGGGCC **配列番号194**
PP7	CCGGAGCAGACGATATGGCGTCGCTCCGG **配列番号195**
SLBP	CCAAAGGCTCTTCTCAGAGCCACCCA **配列番号196**
TAR	GGCCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCC **配列番号197**
ThermoPh	ATATAACCTTCACCATTAGGTTCAAATAATGGTAAT **配列番号198**

【０３０２】

【表１７】

表17.表16のRNA構造の出典

名称	出典
AsCpf1BB	アシダミノコッカス属由来の天然crRNA配列
BoxB	Nat Biotechnol. 2016 May;34(5):528-30.
シュードノット(デコイ)	特許:WO2021092130
シュードノット(evopreQ1)	Nat Biotechnol. 2021 Oct 4. doi: 10.1038/s41587-021-01039-7.
fmpknot	Nature 480, 561-564 (2011)
mpknot	Nat Biotechnol. 2021 Oct 4. doi: 10.1038/s41587-021-01039-7.
MS2	Nat Biotechnol. 2016 May;34(5):528-30.
PP7	Nat Biotechnol. 2016 May;34(5):528-30.
SLBP	Cell. 2019 Jun 27;178(1):122-134.e12.
TAR	Cell. 2019 Jun 27;178(1):122-134.e12.
ThermoPh	Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 8; 96(12): 6621-6625

【０３０３】

本発明の組成物に様々な３’構造化ＲＮＡを含ませた結果が、図３５に提供されている。この実験では、３’ＲＮＡ構造を持つ、または持たない様々なｔａｇＲＮＡを有するＲＴ（５Ｍ）－ＬｂＣａｓ１２ａ　Ｈ７５９Ａを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において発現させた。３日後、細胞を回収し、ハイスループット配列決定によって精密編集の効率を分析した。我々は、ｔａｇＲＮＡ上のほぼ全ての３’ＲＮＡ構造が本発明の方法（例えば、ＲＥＤＲＡＷ）に対応できることを観察した。我々は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において３’ＲＮＡ構造を使用することによるＲＥＤＲＡＷ効率の増加は観察しなかった。

【０３０４】

［実施例１５］

クロマチン調節ペプチド融合体の使用の評価

ゲノム編集タンパク質は、ヌクレオソームによって閉塞され、生細胞内での活性が低下し得る。クロマチン調節タンパク質／ペプチドは、クロマチン交換、ヒストン修飾、およびエピゲノム修飾を促進して、例えば、Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａなどのプログラム可能なＤＮＡ結合タンパク質によるアクセスを強化することにより、そのような影響に対処するのに役立ち得る。

【０３０５】

この可能性を評価するために、ＣＨＤ１（例えば、配列番号１９９）、Ｈ１Ｇ（例えば、配列番号２００）、ＨＢ１（例えば、配列番号２０１）、およびＨＮ１（例えば、配列番号２０２）（例えば、Ｄｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＣＲＩＳＰＲ　Ｊ．２０１９　Ｆｅｂ；２：５１－６３を参照）を含むクロマチン調節ペプチドを、以下のように種々の融合方向で、選択した本発明の構築体に融合させた：ＨＮ１－ＲＴ（５Ｍ）－ＬＢＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）、ＨＮ１－ＲＴ（５Ｍ）－ＬＢＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）－ＨＢ１、ＨＮ１－ＲＴ（５Ｍ）－ＬＢＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）－Ｈ１Ｇ、ＨＮ１－ＲＴ（５Ｍ）－ＬＢＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）－ＣＨＤ１、ＨＮ１－ＲＴ（５Ｍ）－Ｈ１Ｇ－ＬＢＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）とＨＮ１－ＲＴ（５Ｍ）－ＣＨＤ１－ＬＢＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）。

【０３０６】

本発明の構築体とクロマチン調節ペプチドを使用した精密な編集の結果が、図３６に提供されている。追加の融合を伴わない構築体（例えば、ＲＴ（５Ｍ）－ＬｂＣａｓ１２ａＨ７５９Ａ）と比較して、構築体の多くは、精密編集活性の増加をもたらさなかった。ＨＮ１－ＲＴ（５Ｍ）－ＬｂＣａｓ１２ａ（Ｈ７５９Ａ）－ＨＢ１では、ｔａｇＲＮＡのうち２つ、ｔａｇＲＮＡ５およびｔａｇＲＮＡ６を使用した場合、精密編集活性のわずかな増加が観察された。

【０３０７】

［実施例１６］

本発明の構築体の非鋳型鎖の同時ニッキングの評価。

例えば、塩基編集、プライム編集、およびＲＥＤＲＡＷを含むゲノム編集イベントにおける中間体は、ＤＮＡの一方の鎖が酵素によって編集され（所望の編集）、反対側の鎖が野生型配列を含むミスマッチＤＮＡ二重鎖であり得る。そのようなミスマッチを解消して所望の編集を行うことは、所望の編集が細胞内で永続的となることを確実にするために重要となり得る。

【０３０８】

編集を含む鎖の反対側のＤＮＡ鎖をニッキングすると、細胞内のミスマッチ修復（ＭＭＲ）を利用して、編集を永続的にするプロセスが促進されると考えられる。真核生物では、ＭＭＲは、ニックを含むＤＮＡ鎖（これは、新たに合成された鎖であることを示唆しており、したがって「間違い」が含まれている可能性が「高い」）を同定することによって塩基のミスマッチを解消し、その鎖を除去して、完全に相補的なＤＮＡを再合成する。このようにして、野生型配列を含むＤＮＡが除去され、所望の編集を含むＤＮＡと完全に相補的な新しいＤＮＡが作製される。このアプローチは、ベースエディタ（Ｋｏｍｏｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　５３３：４２０－４２４（２０１６））およびプライムエディタ（Ａｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　５７６：１４９－１５７（２０１９））の編集効率の改善に利用されている。

【０３０９】

我々は、本発明の構築体および方法（ＲＥＤＲＡＷ）を用いて同様の評価を試みた。ＲＥＤＲＡＷでは、編集はＤＮＡの鋳型鎖（ｃｒＲＮＡによってハイブリダイズされるＤＮＡ鎖）に含まれる。したがって、編集プロセス中に編集部付近の非鋳型鎖をニッキングすることで、ＲＥＤＲＡＷの精密な編集の効率が向上するかどうかを判断したいと考えた。

【０３１０】

Ｆｕ　ｅｔ　ａｌ．は以前に、１２～１５の塩基位置に様々なミスマッチを含むｃｒＲＮＡにより、Ｃａｓ１２ａがヌクレアーゼとして作用するのではなく、非鋳型鎖ニッカー

ゼとなることとなり得ると報告している（ＴＴＴＶ　ＰＡＭは－４、－３、－２、－１の位置と表記される）（Ｆｕ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１９　Ｍａｙ；４（５）：８８８－８９７）。そのようなアプローチが、本発明の方法および構築体によって達成される精密編集を増加させるのに有効かどうかを調べるために、様々なミスマッチを含むｃｒＲＮＡ（拡張ガイド核酸、ｔａｇＲＮＡとは対照的）を調製し、本発明の構築体と共に標的ＤＮＡを編集するのに利用した。結果を表１８に示す。

【０３１１】

【表１８】

表**18**. 3つの異なるtagRNAを使用した精密な編集の効率(%)。この実験では、RT(5M)-LbCas12a H759A融合にtagRNA15、tagRNA16またはtagRNA17が使用された。本実施例で使用したcrRNAのスペーサーの相補性/ミスマッチについては以下に記載されている。

	tagRNA15	tagRNA16	tagRNA17
crRNAニッキングなし	0.69	0.00	0.51
crRNA; 完全な相補性	0.00	0.00	0.00
crRNA; P12でのミスマッチ	0.00	0.00	4.62
crRNA; P13でのミスマッチ	0.00	0.00	0.00
crRNA; P14でのミスマッチ	0.00	0.00	0.00
crRNA; P15でのミスマッチ	0.00	0.41	0.36
crRNA; P12、13でのミスマッチ	3.77	4.42	4.46
crRNA; P13、14でのミスマッチ	0.15	0.28	1.08
crRNA; P12、13、14でのミスマッチ	0.68	0.66	0.98
crRNA; P13、14、15でのミスマッチ	0.00	0.00	0.74

【０３１２】

ニッキングのないｃｒＲＮＡを使用した処理と比較して、１２～１５位に単一、二重、または三重のミスマッチを含むｃｒＲＮＡは、編集効率の向上を導いた。まとめると、適切なミスマッチを含むｃｒＲＮＡを（ｔａｇＲＮＡに加えて）同時発現させると、非鋳型鎖上にニックを誘導することに使用することができ、それによって本発明の方法の精密編集効率を高めることができる。

【０３１３】

前述のものは、本発明の実例であり、その限定と解釈されるべきでない。本発明は、以下の特許請求の範囲によって定義され、特許請求の範囲の均等物もその中に含まれるべきである。

【図面】

【図１】

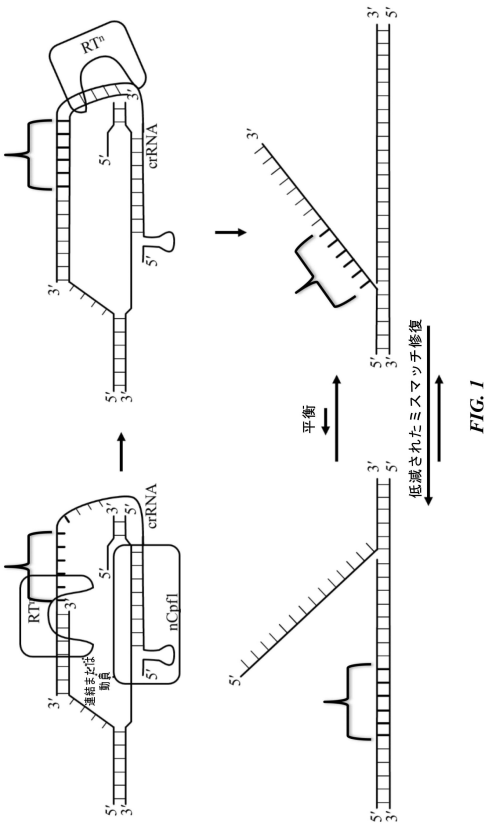


FIG. 1

【図２】

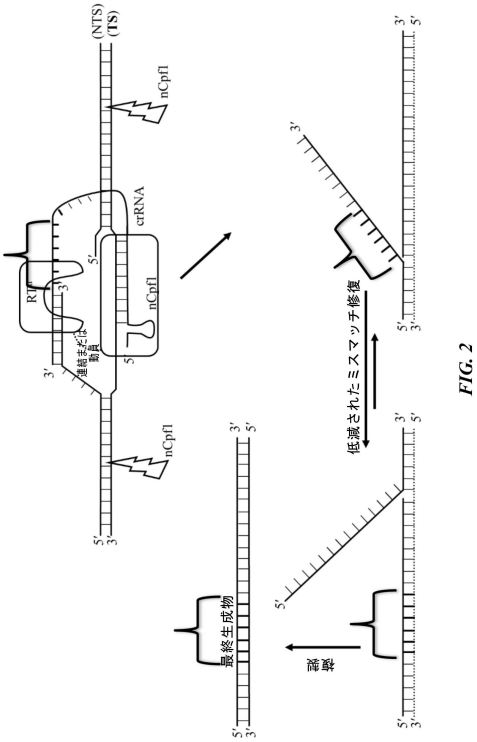


FIG. 2

【図３】

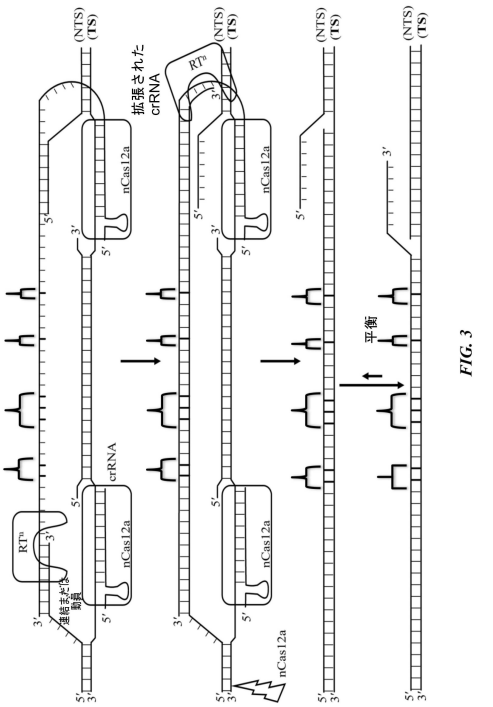


FIG. 3

【図４】

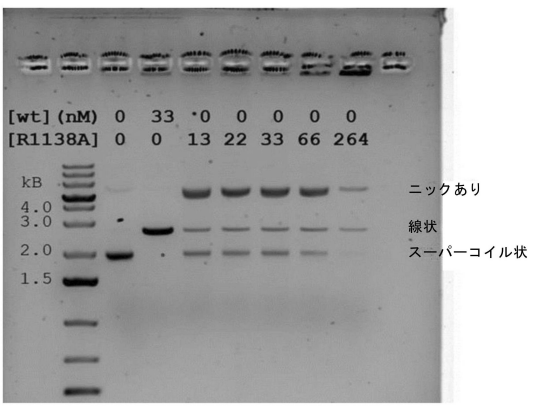


FIG. 4

【図５】

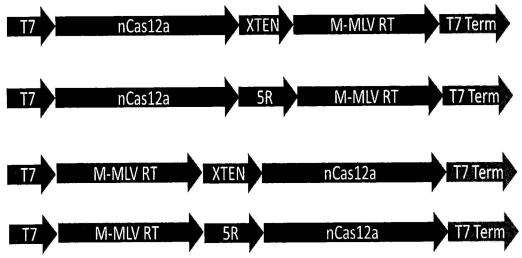


FIG. 5

【図６】

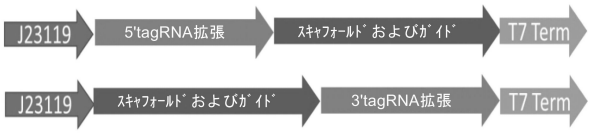


FIG. 6

【図７】

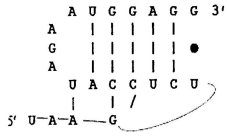


FIG. 7

【図８】

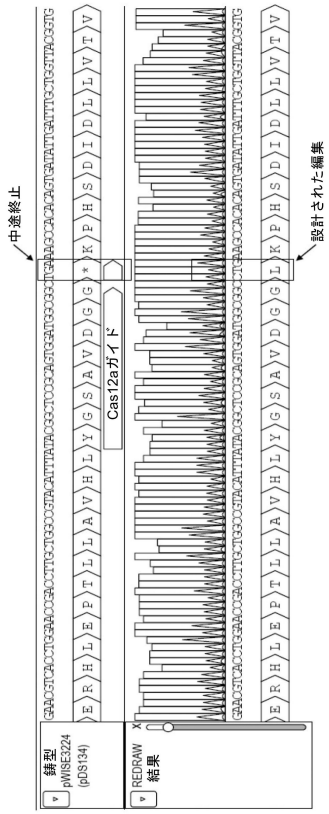


FIG.8

【図９】

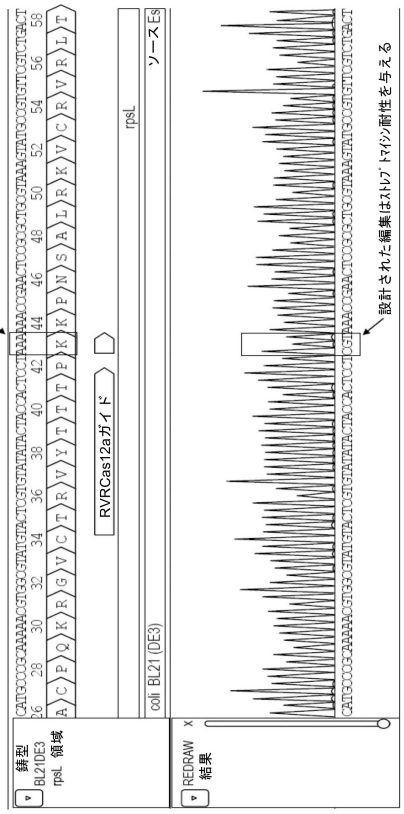


FIG. 9

【図１０】

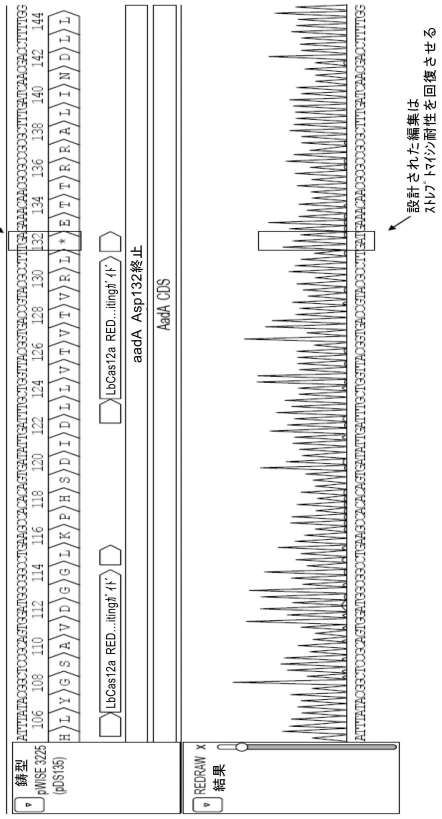


FIG. 10

【図１１】

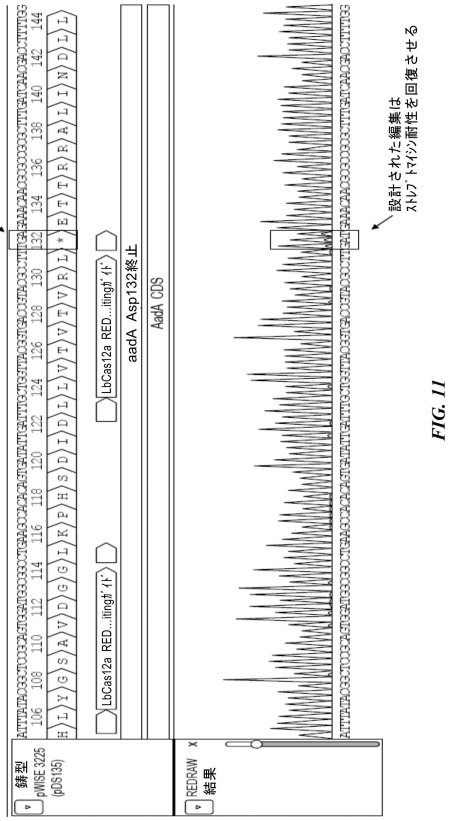


FIG. 11

【図１２】

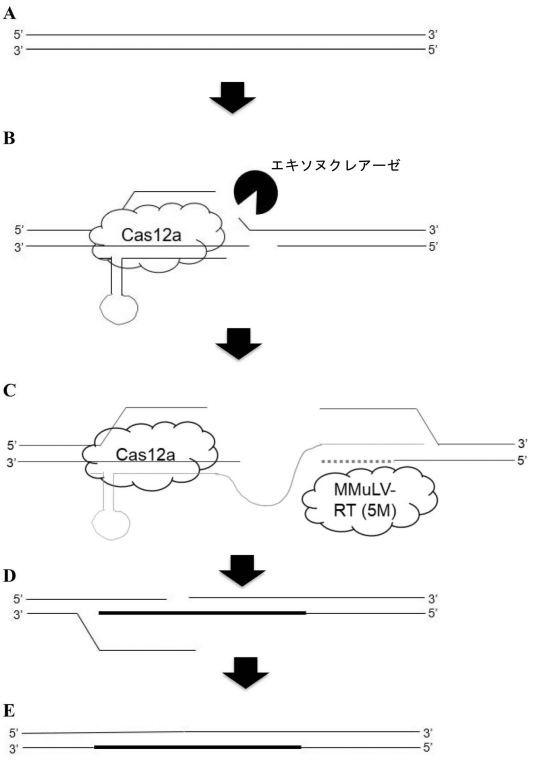


FIG. 12

【図１３】

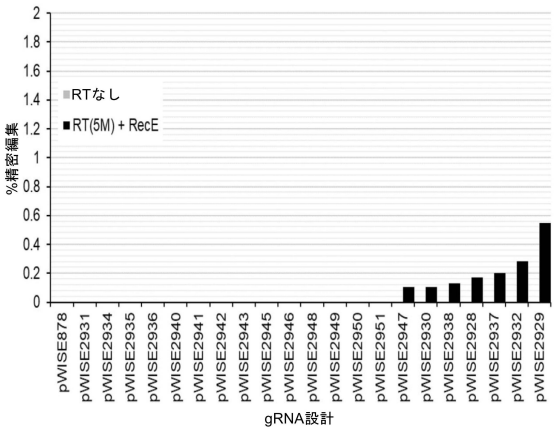


FIG. 13

【図１４】

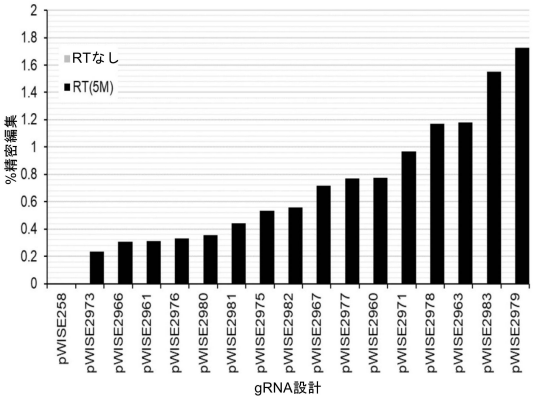


FIG. 14

【図１５】

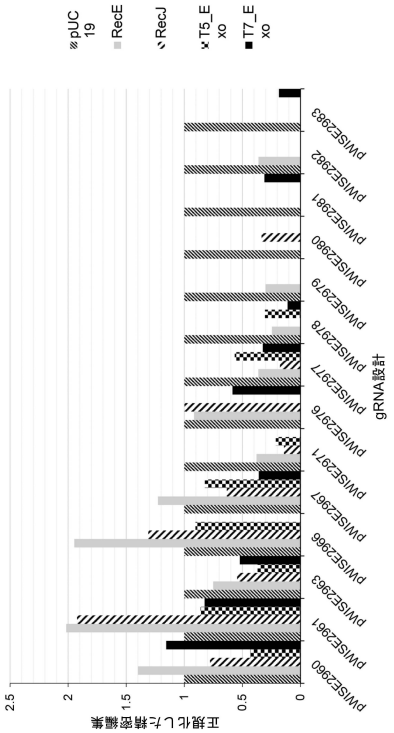


FIG. 15

【図１６】

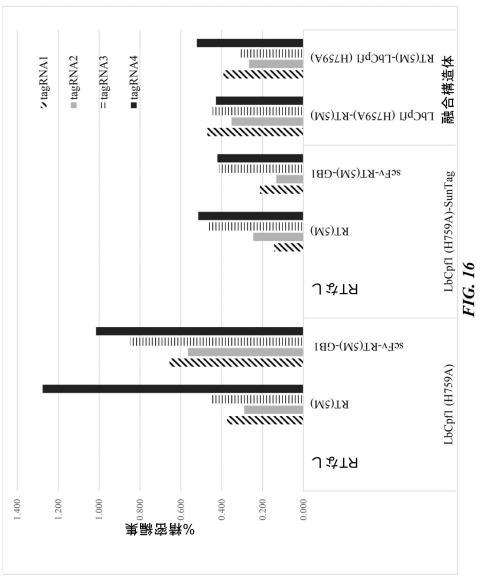


FIG. 16

【図１７】

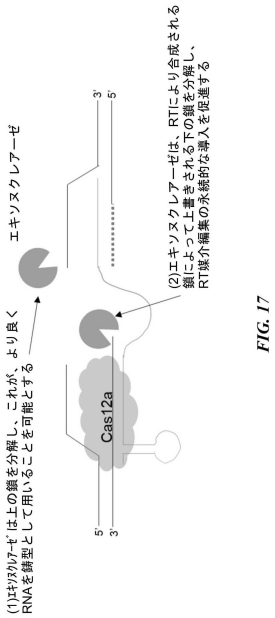


FIG. 17

【図１８】

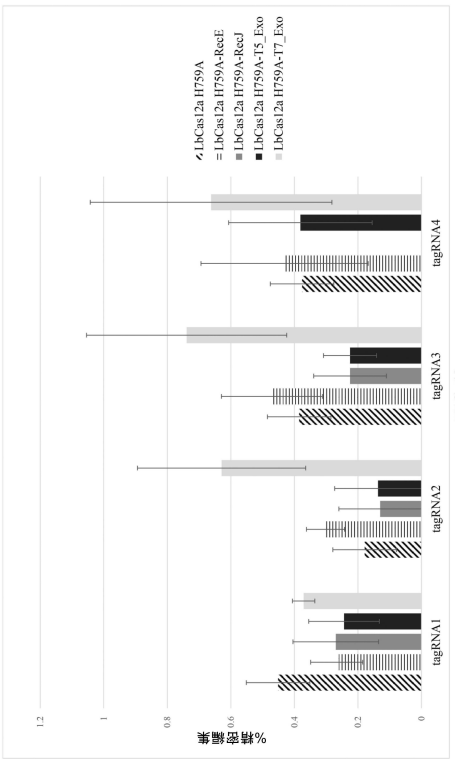


FIG. 18

【図１９】

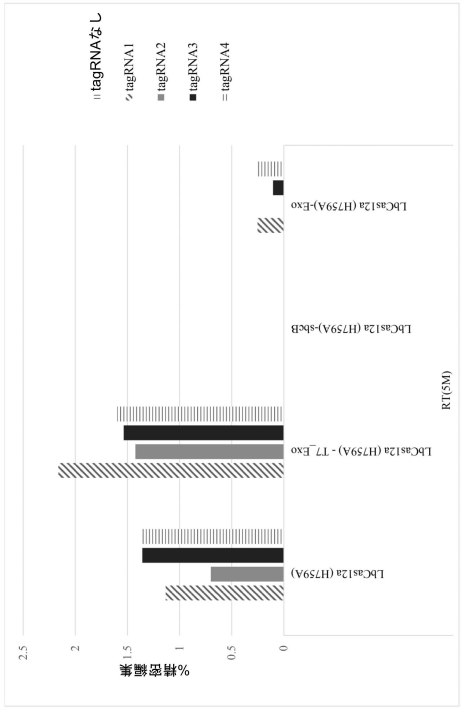


FIG. 19

【図２０】

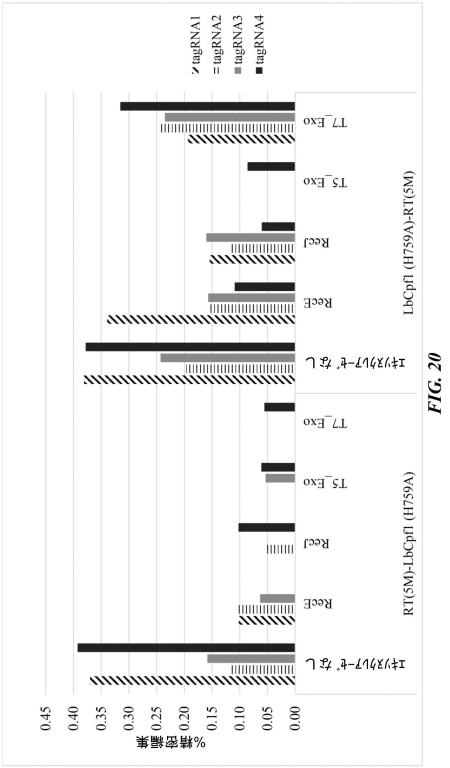


FIG. 20

【図２１】

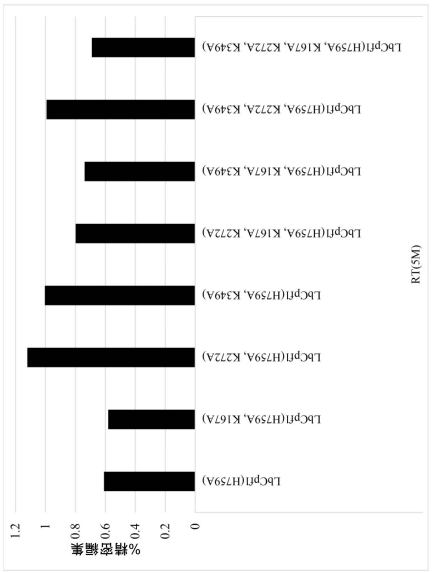


FIG. 21

【図２２】

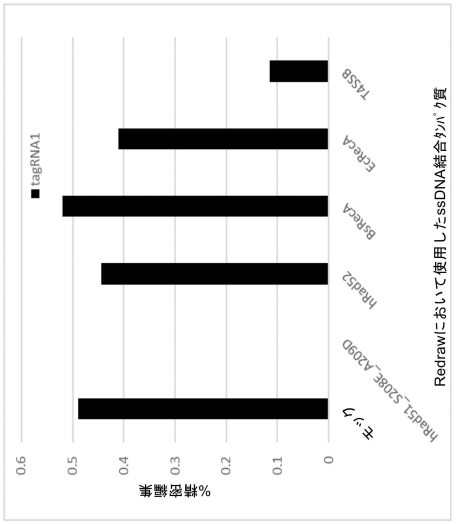


FIG. 22

【図２３】

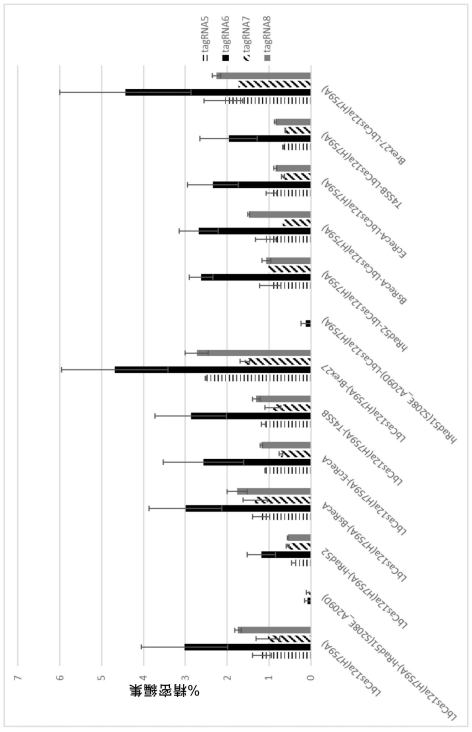


FIG. 23

【図２４】

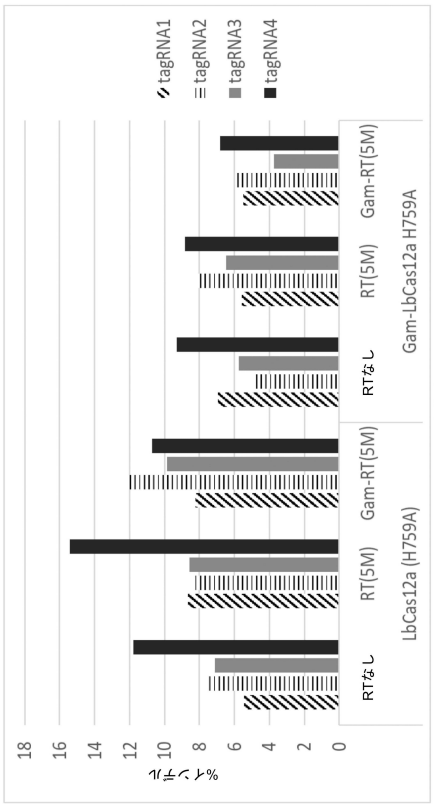


FIG. 24

【図２５】

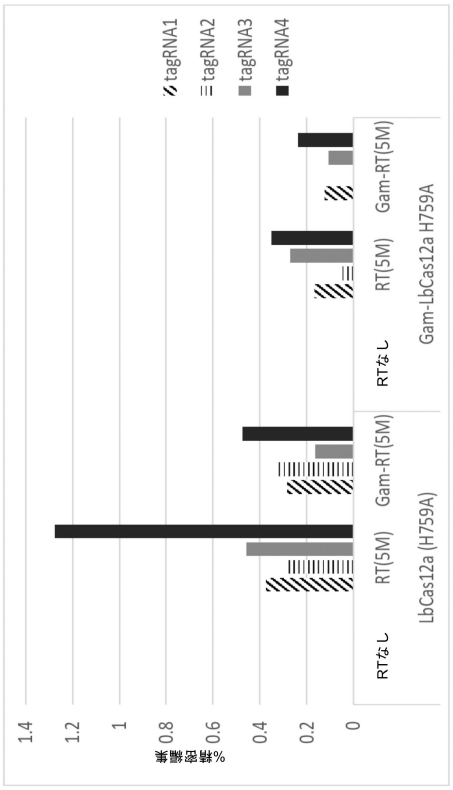


FIG. 25

【図２６】

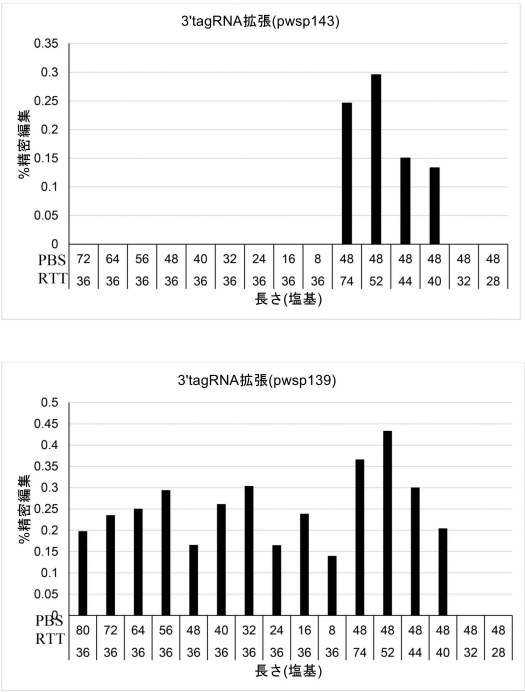


FIG. 26

【図２７】

編集位置	編集位置	%編集
TTT**GG**CTCACTCCTGCTCGGTGAATTT	(-1);1	0.18
TTTCC**GA**CACTCCTGCTCGGTGAATTT	2;3	0.20
TTTCCCT**GT**CTCCTGCTCGGTGAATTT	4;5	0.25
TTTCCCTCA**GA**CCTGCTCGGTGAATTT	6;7	0.27
TTTCCCTCACT**GG**TGCTCGGTGAATTT	8;9	0.24
TTTCCCTCACTCC**AC**CTCGGTGAATTT	10;11	0.19
TTTCCCTCACTCCTG**GA**CGGTGAATTT	12;13	0.30
TTTCCCTCACTCCTGCT**GC**GTGAATTT	14;15	0.45
TTTCCCTCACTCCTGCTCG**CA**GAATTT	16;17	0.26
TTTCCCTCACTCCTGCTCGGT**CT**ATTT	18;19	0.13

編集位置	編集位置	%編集
TTTCGCG**CT**TGTTCCAATCAGTACGCA	4;5	0.13
TTTCGCGGA**AC**TTCCAATCAGTACGCA	6;7	0.00
TTTCGCGGATG**AA**CCAATCAGTACGCA	8;9	0.12
TTTCGCGGATGTT**GG**AATCAGTACGCA	10;11	0.25
TTTCGCGGATGTTCC**TT**TCAGTACGCA	12;13	0.33
TTTCGCGGATGTTCCAA**AG**AGTACGCA	14;15	0.15
TTTCGCGGATGTTCCAATC**TC**TACGCA	16;17	0.21
TTTCGCGGATGTTCCAATCAG**AT**CGCA	18;19	0.13

FIG. 27

【図２８】

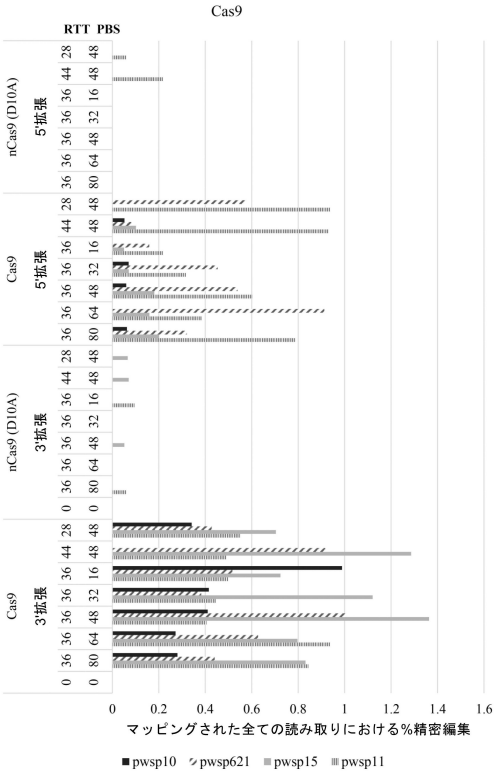


FIG. 28

【図２９】

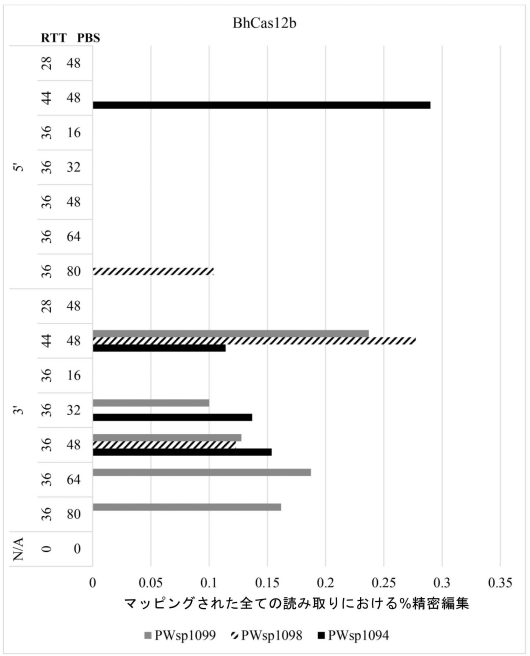


FIG. 29

【図３０】

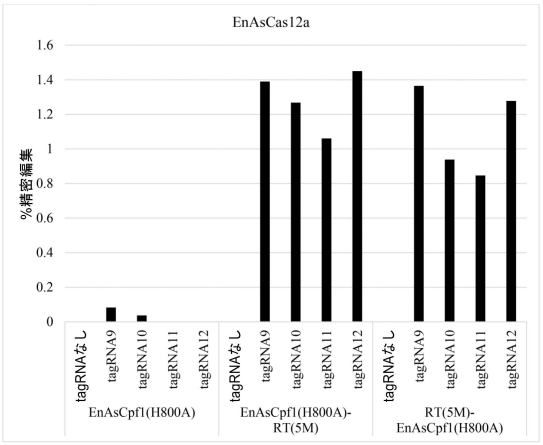


FIG. 30

【図３１】

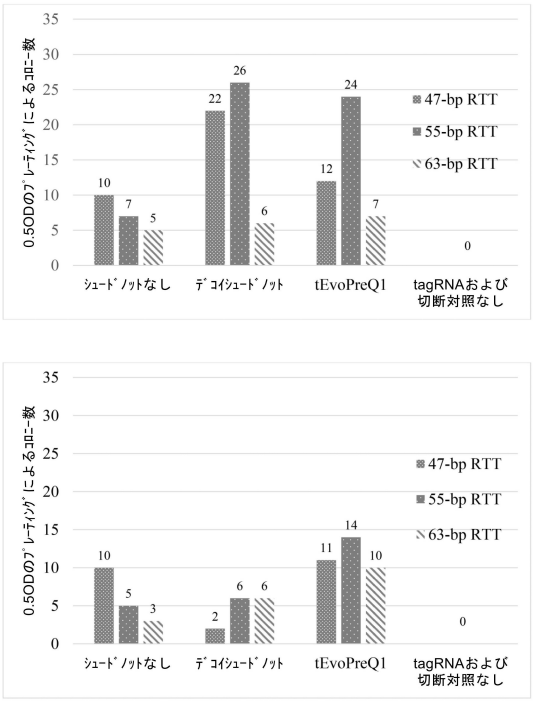


FIG. 31

【図３２】

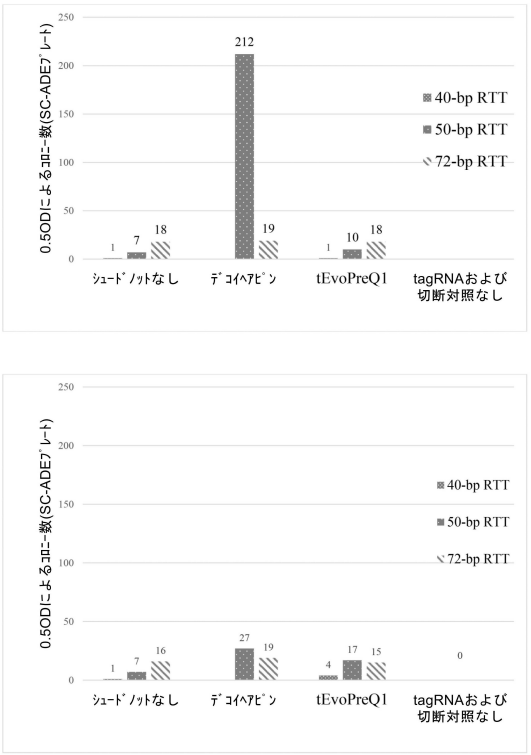


FIG. 32

【図３３】

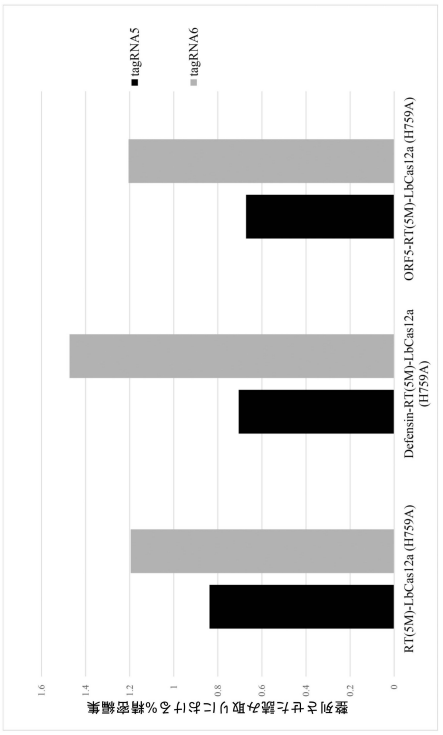


FIG. 33

【図３４】

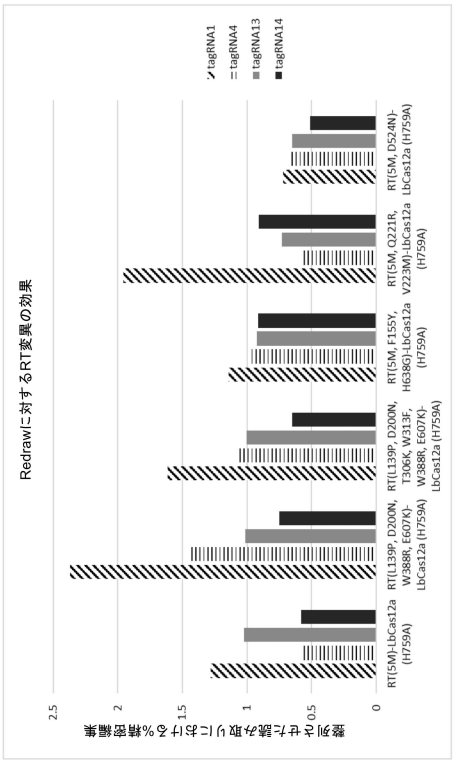


FIG. 34

【図３５】

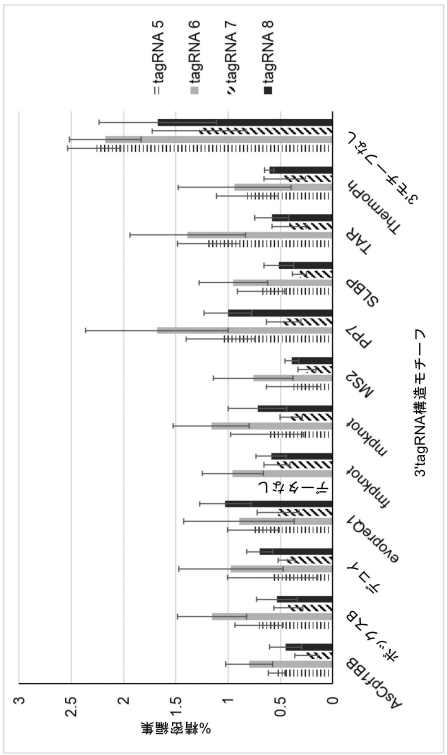


FIG. 35

【図３６】

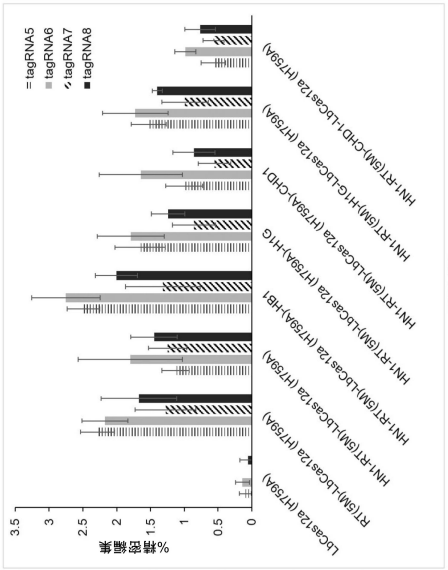


FIG. 36

【図３７】

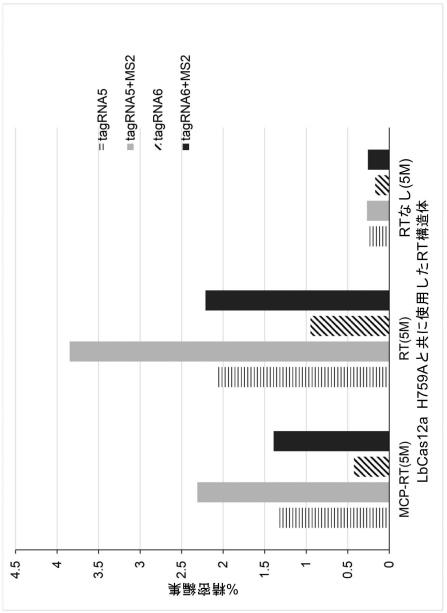


FIG. 37

【配列表】

<u>20235493390000001.app</u>

【国際調査報告】

International application No.
PCT/US2021/058235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] 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 13ter.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 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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/US2021/058235

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:
1-45, 47-103(all partially)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/058235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 C12N15/11 C12N15/62 C12N9/12 C12N9/22
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C40B C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/191153 A2 (BROAD INST INC [US]; HARVARD COLLEGE [US] ET AL.) 24 September 2020 (2020-09-24)	1-7, 12-25, 27-30, 32, 37-42, 53, 60-66, 69, 86-100
Y	paragraphs [0032] - [0046], [0090], [0122], [0150], [0151], [0166], [0185], [0213] - [0215] paragraphs [0341], [0345] - [0360], [0371] - [0377], [0404], [0420] - [0434], [0472] - [0496]; claims 1-18,33-39,95,106-108; figure 1 paragraphs [0567], [0651] - [0654], [0707] - [0744]	8-11,26, 31, 33-36, 43-45, 47-52, 54-59, 67,68, 70-85, 101-103

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 February 2022	03/05/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bucka, Alexander

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/058235

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/191234 A1 (BROAD INST INC [US]; HARVARD COLLEGE [US]) 24 September 2020 (2020-09-24)	1-7, 12-25, 27-30, 32, 37-42, 53, 60-66, 69, 86-100
Y	paragraphs [0218], [0219], [0312] - [0322], [0335] - [0338], [0340] - [0342], [0430] - [0462], [2196] - [2251]; claims 1-7; figure 1	8-11,26, 31, 33-36, 43-45, 47-52, 54-59, 67,68, 70-85, 101-103
A	JIANG YUAN-YUAN ET AL: "Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize", GENOME BIOLOGY, vol. 21, no. 1, 6 October 2020 (2020-10-06), XP055894320, DOI: 10.1186/s13059-020-02170-5 Retrieved from the Internet: URL:https://genomebiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13059-020-02170-5.pdf > page 2; figure 1	1-45, 47-103
A	XU RONGFANG ET AL: "Development of Plant Prime-Editing Systems for Precise Genome Editing", PLANT COMMUNICATIONS, vol. 1, no. 3, 8 April 2020 (2020-04-08), page 100043, XP055894050, ISSN: 2590-3462, DOI: 10.1016/j.xplc.2020.100043 page 6, left-hand column; figures 1,3	1-45, 47-103
A	WO 2018/022634 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL [US]) 1 February 2018 (2018-02-01) page 3; claims 1-3,22; table A	1-45, 47-103
A	US 2019/218547 A1 (LEE KUNWOO [US] ET AL) 18 July 2019 (2019-07-18) claims 1-5	1-45, 47-103

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/058235

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MING MEILING ET AL: "CRISPR-Cas12b enables efficient plant genome engineering", NATURE PLANTS, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 6, no. 3, 9 March 2020 (2020-03-09), pages 202-208, XP037062240, DOI: 10.1038/S41477-020-0614-6 page 207, left-hand column -----	1-45, 47-103
A	ANZALONE ANDREW V ET AL: "Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 576, no. 7785, 21 October 2019 (2019-10-21), pages 149-157, XP036953141, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/S41586-019-1711-4 [retrieved on 2019-10-21] Extended Data Fig. 1 Extended Data Fig. 3; figure 1 -----	1-45, 47-103
A	BABA MISATO ET AL: "Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 30, no. 8, 31 August 2017 (2017-08-31), pages 551-557, XP055788110, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzx046 Retrieved from the Internet: URL:https://watermark.silverchair.com/gzx046.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAArUwggKxBgkqhkiG9w0BBwagggKiMIICngIBADCCApcGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMZ3lxkswJ8pZE7qyAAgEQgIICaLHgkYVqGHn714EGYFNY_HTDmmzMsxMCatRTRgrEWS0XUw9e8SVesGzku-lx4nLrsPBTi00RH9tEyM78okuwOC45fecYz> table II -----	1-45, 47-103

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/058235

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIN QIUPENG ET AL: "Prime genome editing in rice and wheat", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 38, no. 5, 16 March 2020 (2020-03-16) , pages 582-585, XP037113496, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/S41587-020-0455-X [retrieved on 2020-03-16] Methods Plasmid construction; figure 1 -----	1-45, 47-103
A	BANDYOPADHYAY ANINDYA ET AL: "CRISPR-Cas12a (Cpf1): A Versatile Tool in the Plant Genome Editing Tool Box for Agricultural Advancement", FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, vol. 11, 2 November 2020 (2020-11-02), XP055871425, DOI: 10.3389/fpls.2020.584151 figures 3,4 -----	1-45, 47-103
X,P	WO 2021/092130 A1 (PAIRWISE PLANTS SERVICES INC [US]) 14 May 2021 (2021-05-14) claims 1-36,65,83; examples 1,2 -----	1-45, 47-103

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/058235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020191153 A2	24-09-2020	AU 2020240109 A1	30-09-2021
		AU 2020242032 A1	07-10-2021
		CA 3129988 A1	24-09-2020
		CA 3130488 A1	24-09-2020
		CN 113891936 A	04-01-2022
		CN 113891937 A	04-01-2022
		CN 114127285 A	01-03-2022
		DE 112020001306 T5	27-01-2022
		DE 112020001339 T5	13-01-2022
		DE 112020001342 T5	13-01-2022
		EP 3942040 A1	26-01-2022
		EP 3942041 A1	26-01-2022
		EP 3942042 A1	26-01-2022
		EP 3942043 A2	26-01-2022
		KR 20210142210 A	24-11-2021
		KR 20210143230 A	26-11-2021
		SG 11202109679V A	28-10-2021
		SG 11202109882V A	28-10-2021
		WO 2020191153 A2	24-09-2020
		WO 2020191171 A1	24-09-2020
		WO 2020191233 A1	24-09-2020
		WO 2020191234 A1	24-09-2020
		WO 2020191239 A1	24-09-2020
		WO 2020191241 A1	24-09-2020
		WO 2020191242 A1	24-09-2020
		WO 2020191243 A1	24-09-2020
		WO 2020191245 A1	24-09-2020
		WO 2020191246 A1	24-09-2020
		WO 2020191248 A1	24-09-2020
		WO 2020191249 A1	24-09-2020
WO 2020191234 A1	24-09-2020	AU 2020240109 A1	30-09-2021
		AU 2020242032 A1	07-10-2021
		CA 3129988 A1	24-09-2020
		CA 3130488 A1	24-09-2020
		CN 113891936 A	04-01-2022
		CN 113891937 A	04-01-2022
		CN 114127285 A	01-03-2022
		DE 112020001306 T5	27-01-2022
		DE 112020001339 T5	13-01-2022
		DE 112020001342 T5	13-01-2022
		EP 3942040 A1	26-01-2022
		EP 3942041 A1	26-01-2022
		EP 3942042 A1	26-01-2022
		EP 3942043 A2	26-01-2022
		KR 20210142210 A	24-11-2021
		KR 20210143230 A	26-11-2021
		SG 11202109679V A	28-10-2021
		SG 11202109882V A	28-10-2021
		WO 2020191153 A2	24-09-2020
		WO 2020191171 A1	24-09-2020
		WO 2020191233 A1	24-09-2020
		WO 2020191234 A1	24-09-2020
		WO 2020191239 A1	24-09-2020
		WO 2020191241 A1	24-09-2020
		WO 2020191242 A1	24-09-2020
		WO 2020191243 A1	24-09-2020
		WO 2020191245 A1	24-09-2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/058235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2020191246 A1	24-09-2020
		WO 2020191248 A1	24-09-2020
		WO 2020191249 A1	24-09-2020
WO 2018022634 A1	01-02-2018	AU 2017302551 A1	31-01-2019
		CA 3031414 A1	01-02-2018
		CN 109790527 A	21-05-2019
		EP 3491133 A1	05-06-2019
		US 2018030425 A1	01-02-2018
		US 2022017883 A1	20-01-2022
		US 2022025347 A1	27-01-2022
		WO 2018022634 A1	01-02-2018
US 2019218547 A1	18-07-2019	NONE	
WO 2021092130 A1	14-05-2021	US 2021130835 A1	06-05-2021
		WO 2021092130 A1	14-05-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2021/058235

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-45, 47-103(all partially)

A method of modifying a target nucleic acid, the method comprising: contacting the target nucleic acid with (a) a Type V CRISPR-Cas effector protein; (b) a reverse transcriptase, and (c) an extended guide nucleic acid, thereby modifying the target nucleic acid.

---

2. claims: 46(completely); 1-45, 47-103(partially)

A method of modifying a target nucleic acid, the method comprising: contacting the target nucleic acid with (a) a Type II CRISPR-Cas effector protein; (b) a reverse transcriptase, and (c) an extended guide nucleic acid, thereby modifying the target nucleic acid.

---

3. claims: 104-136

A method of modifying a target nucleic acid, the method comprising: contacting the target nucleic acid at a first site with (a) (i) a first CRISPR-Cas effector protein; and (ii) a first extended guide nucleic acid (e.g., extended CRISPR RNA, extended CRISPR DNA, extended crRNA, extended crDNA); and (b) (i) a second CRISPR-Cas effector protein, (ii) a first reverse transcriptase; and(ii) a first guide nucleic acid, thereby modifying the target nucleic acid.

---

4. claims: 137-142

An extended guide nucleic acid comprising (i) a Type V CRISPR nucleic acid or Type II CRISPR nucleic acid (Type II or Type V CRISPR RNA, Type II or Type V CRISPR DNA, Type II or Type V crRNA, Type II or Type V crDNA) and/or a Type V CRISPR nucleic acid or Type II CRISPR nucleic acid and a tracr nucleic acid (e.g., Type II or Type V tracrRNA, Type II or Type V tracrDNA); and (ii) an extended portion comprising a primer binding site and a reverse transcriptase template (RT template) (RTT).

---

5. claims: 143-154

A complex comprising: (a) a Type V CRISPR-Cas effector protein or a Type II CRISPR-Cas effector protein;(b) a reverse transcriptase, and (c) an extended guide nucleic acid (e.g., extended CRISPR RNA, extended CRISPR DNA, extended crRNA, extended crDNA).

International Application No. PCT/US2021/058235

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

6. claims: 155-162(completely); 171-173(partially)

An expression cassette codon optimized for expression in an organism, comprising 5' to 3': (a) polynucleotide encoding a promoter sequence ,(b) a polynucleotide encoding a Type V CRISPR-Cas nuclease or a Type II CRISPR-Cas nuclease that is codon optimized for expression in the organism;(c) a linker sequence; and(d) a polynucleotide encoding a reverse transcriptase that is codon-optimized for expression in the organism.

---

7. claims: 163-170(completely); 171-173(partially)

An expression cassette codon optimized for expression in a plant, comprising: (a) a polynucleotide encoding a plant specific promoter sequence, and (b) an extended guide nucleic acid, wherein the extended guide nucleic acid comprises an extended portion comprising at its 3' end a primer binding site and an edit to be incorporated into the target nucleic acid, optionally wherein the extended guide nucleic acid is comprised in an expression cassette, optionally wherein the extended guide nucleic acid is operably linked to a Pol II promoter.

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	*15/55*	*(2006.01)*	C12N	15/55		
C12N	*15/54*	*(2006.01)*	C12N	15/54		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N	*7/01*	*(2006.01)*	C12N	7/01		
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	
A01H	*1/00*	*(2006.01)*	A01H	1/00	A	

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　田中 祐

(74)代理人　100180231

弁理士　水島 亜希子

(72)発明者　キム，ヨンジュ

アメリカ合衆国，ノースカロライナ州，チェペル・ヒル，サー・リチャード・レーン　１１４

(72)発明者　ワッツ，ジョセフ・マシュー

アメリカ合衆国，ノースカロライナ州，ケーリー，ライリック・コート　１１５

(72)発明者　ヒュンメル，アーロン

アメリカ合衆国，ノースカロライナ州，ヒルズボロ，ライン・ロード　２１１７

(72)発明者　ローウィット，シャイ・ジョシュア

アメリカ合衆国，ノースカロライナ州，ダラム，リバー・ストーン・ロード　３８２４

(72)発明者　シュヴァルク，デイヴィッド

アメリカ合衆国，ノースカロライナ州，エイペックス，マーストン・コート　１００４

Ｆターム（参考）　2B030　CA14 CA17

4B065　AA90X AB01 AC14 BA02 CA60

4H045　AA10 AA30 BA09 BA41 DA89 EA60 FA74