

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-526858

(P2021-526858A)

(43) 公表日 令和3年10月11日(2021.10.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 5 0
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 120 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2021-518052 (P2021-518052)
 (86) (22) 出願日 令和1年6月7日 (2019.6.7)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年2月5日 (2021.2.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/036021
 (87) 国際公開番号 WO2019/236982
 (87) 国際公開日 令和1年12月12日 (2019.12.12)
 (31) 優先権主張番号 62/682, 271
 (32) 優先日 平成30年6月8日 (2018.6.8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

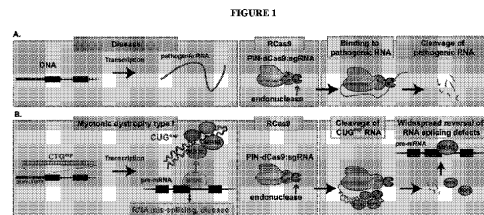
(71) 出願人 520481046
 ロックアネイビオ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21, サンディエゴ, ジョン ホブキ
 ンズ コート 3545, 스위트 2
 00
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNA 標的化融合タンパク質組成物および使用方法

(57) 【要約】

(a) RNA 分子内の標的配列に特異的に結合するガイドRNA (gRNA) を含む配列と、(b) 第1のRNA 結合性ポリペプチドをコードする配列と第2のRNA 結合性ポリペプチドをコードする配列とを含む融合タンパク質をコードする配列とを含む組成物であって、第1のRNA 結合性ポリペプチドも第2のRNA 結合性ポリペプチドも有意なDNAヌクレアーゼ活性を含まず、第1のRNA 結合性ポリペプチドおよび第2のRNA 結合性ポリペプチドが同一ではなく、かつ第2のRNA 結合性ポリペプチドがRNAヌクレアーゼ活性を含む、組成物が開示される。本開示の組成物を作製する方法およびそれを使用する方法も提供される。例えば、本開示の組成物を対象における疾患または障害の処置において使用することができる。本開示の例示的な疾患または障害は、遺伝性およびエピジェネティックな疾患または障害を含む。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 第 1 の RNA 結合性ポリペプチドまたはその一部と (b) 第 2 の RNA 結合性ポリペプチドとを含む RNA によりガイドされる標的 RNA 結合性融合タンパク質をコードする核酸配列を含む組成物であって、前記第 1 の RNA 結合性ポリペプチドが、g RNA 配列によってガイドされると標的 RNA に結合し、前記第 2 の RNA 結合性ポリペプチドが、RNA ヌクレアーゼ活性を含む、組成物。

【請求項 2】

前記第 1 の RNA 結合性ポリペプチドまたはその一部が、CRISPR/Cas ポリペプチドまたはその一部である、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記 CRISPR/Cas ポリペプチドまたはその一部が、Cas 9、Cpf1、Cas 13a、Cas 13b、Cas 13c および CasRX/Cas 13d からなる群から選択され、前記 CRISPR/Cas ポリペプチドが、ネイティブな活性、低下した活性またはヌル活性を有する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記第 2 の RNA 結合性ポリペプチドが、RNA と会合する様式で RNA に結合する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記第 2 の RNA 結合性ポリペプチドが、RNA を切断する様式で RNA と会合する、請求項 4 に記載の組成物。

20

【請求項 6】

前記核酸配列が、プロモーターを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記プロモーターが、構成的プロモーターまたは組織特異的プロモーターである、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記核酸配列が g RNA 配列をさらに含み、前記 g RNA 配列が、RNA 分子内の標的配列に特異的に結合するスペーサー配列および前記第 1 の RNA 結合性ポリペプチドに特異的に結合する足場配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 9】

前記スペーサー配列が、CUG (配列番号 18)、CCUG (配列番号 19)、CAG (配列番号 80)、GGGGCC (配列番号 81)、およびこれらの組合せからなる群から選択される配列の少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、または 7 つのリピートを含む配列を含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記核酸配列が、前記 g RNA 配列の発現を駆動するプロモーターを含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記プロモーターが、ポリメラーゼ III プロモーターである、請求項 9 に記載の組成物。

40

【請求項 12】

前記ポリメラーゼ III プロモーターが、U6 プロモーターである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記プロモーターが、tRNA プロモーターである、請求項 1 または 9 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記融合タンパク質が、NLS、NES またはタグを含む、請求項 1 または 9 に記載の組成物。

50

【請求項 15】

請求項 1 または 8 に記載の組成物を含むベクター。

【請求項 16】

アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ナノ粒子、ミセル、リポソーム、リブレックス、ポリマーソーム、リブレックス、およびデンドリマーからなる群から選択される、請求項 15 に記載のベクター。

【請求項 17】

請求項 15 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 18】

前記第 2 の RNA 結合性ポリペプチドが、RNAse 1、RNAse 4、RNAse 6、RNAse 7、RNAse 8、RNAse 2、RNAse 6 PL、RNAse L、RNAse T 2、RNAse 11、RNAse T 2 様、NOB 1、ENDO V、ENDO G、ENDO D 1、hFEN 1、hSLFN 1 4、hLACTB 2、APEX 2、ANG、HRS P 1 2、ZC 3 H 1 2 A、RIDA、PDL 6、NTHL、KIAA 0 3 9 1、APEX 1、AGO 2、EXO G、ZC 3 H 1 2 D、ERN 2、PELO、YBEY、CPS F 4 L、hCG_2 0 0 2 7 3 1、ERCC 1、RAC 1、RAA 1、RAB 1、DNA 2、FLJ 3 5 2 2 0、FLJ 1 3 1 7 3、ERCC 4、Rnase 1 (K 4 1 R)、Rnase 1 (K 4 1 R、D 1 2 1 E)、Rnase 1 (K 4 1 R、D 1 2 1 E、H 1 1 9 N)、Rnase 1 (H 1 1 9 N)、Rnase 1 (R 3 9 D、N 6 7 D、N 8 8 A、G 8 9 D、R 9 1 D、H 1 1 9 N)、Rnase 1 (R 3 9 D、N 6 7 D、N 8 8 A、G 8 9 D、R 9 1 D、H 1 1 9 N、K 4 1 R、D 1 2 1 E)、Rnase 1 (R 3 9 D、N 6 7 D、N 8 8 A、G 8 9 D、R 9 1 D)、TENM 1、TENM 2、RNAse K、TAL EN、および ZNF 6 3 8 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

10

20

【請求項 19】

(a) RNA 分子内の標的配列に特異的に結合するスパーサー配列および第 1 の RNA 結合性ポリペプチドに特異的に結合する足場配列を含むガイド RNA (gRNA) 配列、

(b) 第 1 の RNA 結合性ポリペプチドと第 2 の RNA 結合性ポリペプチドをコードする配列とを含む融合タンパク質をコードする核酸配列と

を含む組成物であって、

前記第 1 の RNA 結合性ポリペプチドも前記第 2 の RNA 結合性ポリペプチドも有意な DNA ヌクレアーゼ活性を含まず、

前記第 1 の RNA 結合性ポリペプチドおよび前記第 2 の RNA 結合性ポリペプチドが同一ではなく、かつ

前記第 2 の RNA 結合性ポリペプチドが、RNA ヌクレアーゼ活性を含む、組成物。

30

【請求項 20】

標的 RNA 分子または前記 RNA 分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変するための方法であって、請求項 19 に記載の組成物と前記 RNA 分子を、前記融合タンパク質またはその一部の前記 RNA 分子への結合に適した条件下で接触させることを含む方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、分子生物学を対象とし、より詳細には、RNA 分子の発現および活性を改変するための組成物および方法を対象とする。

関連出願

【0002】

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、2018年6月8日出願の米国特許出願第 62 / 682 , 271 号の優先権を主張するものである。2018年6月8日出願の米国特許出願第 62 / 682 , 276 号の内容は、それらの全体が参照に

50

より本明細書に組み込まれる。

配列表の組み込み

【0003】

2019年6月6日に作成された773KBサイズの「LOCN__002__001WO__SeqList__ST25」という名称のテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

RNA分子またはRNA分子によってコードされるタンパク質の発現または活性を改変するための標的RNA分子に特異的に結合する方法について長年にわたるが満たされていない必要性が当技術分野において存在する。本開示は、RNA分子を配列特異的な様式で特異的に標的とし、さらにDNA配列の改変を排除する組成物および方法を提供する。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、(a) RNA分子内の標的配列に特異的に結合するガイドRNA (gRNA) を含む配列と、(b) 第1のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列と第2のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列とを含む融合タンパク質をコードする配列を含む組成物であって、第1のRNA結合性ポリペプチドも第2のRNA結合性ポリペプチドも有意なDNAヌクレアーゼ活性を含まず、第1のRNA結合性ポリペプチドと第2のRNA結合性ポリペプチドが同一ではなく、かつ第2のRNA結合性ポリペプチドが、RNAヌクレアーゼ活性を含む、組成物を提供する。

20

【0006】

本開示は、(a) 第1のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列またはその一部と、(b) 第2のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列とを含むRNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質をコードする配列を含む組成物であって、第1のRNA結合性ポリペプチドが、gRNA配列によってガイドされた標的RNAに結合し、第2のRNA結合性ポリペプチドが、RNAヌクレアーゼ活性を含む、組成物も提供する。

【0007】

本開示は、(a) 第1のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列またはその一部と、(b) 第2のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列とを含む標的RNA結合性融合タンパク質をコードする配列を含む組成物であって、第1のRNA結合性ポリペプチドが、gRNA配列を有さない標的RNAに結合し、第2のRNA結合性ポリペプチドが、RNAヌクレアーゼ活性を含む、組成物をさらに提示する。

30

【0008】

本開示の組成物の一部の実施形態では、標的配列は、少なくとも1つのリピート配列を含む。

【0009】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAを含む配列は、gRNAを真核細胞において発現させることができるプロモーターをコードする配列をさらに含む。

40

【0010】

本開示の組成物の一部の実施形態では、真核細胞は、動物細胞である。一部の実施形態では、動物細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、動物細胞は、ヒト細胞である。

【0011】

本開示の組成物の一部の実施形態では、プロモーターは、構成的に活性なプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列は、RNAポリメラーゼの発現を駆動することができるプロモーターから単離されるまたはそれに由来する。一部の実施形態では、プロモーター配列は、U6プロモーターから単離されるまたはそれに由来する。一部の

50

実施形態では、プロモーターは、転移RNA (tRNA) の発現を駆動することができるプロモーターから単離されたまたはそれに由来する配列である。一部の実施形態では、プロモーターは、アラニン tRNA プロモーター、アルギニン tRNA プロモーター、アスパラギン tRNA プロモーター、アスパラギン酸 tRNA プロモーター、システイン tRNA プロモーター、グルタミン tRNA プロモーター、グルタミン酸 tRNA プロモーター、グリシン tRNA プロモーター、ヒスチジン tRNA プロモーター、イソロイシン tRNA プロモーター、ロイシン tRNA プロモーター、リシン tRNA プロモーター、メチオニン tRNA プロモーター、フェニルアラニン tRNA プロモーター、プロリン tRNA プロモーター、セリン tRNA プロモーター、トレオニン tRNA プロモーター、トリプトファン tRNA プロモーター、チロシン tRNA プロモーター、またはバリン tRNA プロモーターから単離されるまたはそれに由来する。一部の実施形態では、プロモーターは、バリン tRNA プロモーターから単離されるまたはそれに由来する。

10

【0012】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAを含む配列は、標的RNA配列に特異的に結合するスペーサー配列をさらに含む。一部の実施形態では、スペーサー配列は、標的RNA配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、87%、90%、95%、97%、99%またはその間の任意のパーセンテージの相補性を有する。一部の実施形態では、スペーサー配列は、標的RNA配列に対して100%の相補性を有する。一部の実施形態では、スペーサー配列は、20ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、スペーサー配列は、21ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、スペーサー配列は、配列

20

【化1】

UGGAGCGAGCAUCCCCAAA (配列番号 1), GUUUGGGGGAUGCUCGCUCCA (配列番号 2), CCCUCACUGCUGGGGAGUCC (配列番号 3),
 GGACUCCCCAGCAGUGAGGG (配列番号 4), GCAACUGGAUCAAUUUGCUG (配列番号 5), GCAGCAAUUGAUCCAGUUGC (配列番号 6),
 GCAUUCUUAUCUGGUCAGUGC (配列番号 7), GCACUGACCAGAUAAAGAAUG (配列番号 8), GAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG (配列番号 9),
 GCAGGCAGGCAGGCAGGCAGG (配列番号 10), GCCCCGGCCCCGGCCCCGGC (配列番号 11), or GCTGCTGCTGCTGCTGCTGC (配列番号 12),
 GGGGCCGGGGCCGGGGCCGG (配列番号 74), GGGCCGGGGCCGGGGCCGGG (配列番号 75), GGCCGGGGCCGGGGCCGGGG (配列番号 76),
 GCCGGGGCCGGGGCCGGGGC (配列番号 77), CCGGGGCCGGGGCCGGGGCC (配列番号 78), または CGGGGCCGGGGCCGGGGCCG (配列番号 79)

30

を含むまたはそれからなる。

40

【0013】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAを含む配列は、標的RNA配列に特異的に結合するスペーサー配列をさらに含む。一部の実施形態では、スペーサー配列は、標的RNA配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、87%、90%、95%、97%、99%またはその間の任意のパーセンテージの相補性を有する。

【0014】

一部の実施形態では、スペーサー配列は、標的RNA配列に対して100%の相補性を有する。一部の実施形態では、スペーサー配列は、20ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、スペーサー配列は、21ヌクレオチドを含むまたはそれか

50

らなる。一部の実施形態では、スパーサー配列は、配列 G U G A U A A G U G G A A U G C C A U G (配列番号 14)、C U G G U G A A C U U C C G A U A G U G (配列番号 15)、または G A G A T A T A G C C T G G T G G T T C (配列番号 16) を含むまたはそれからなる。

【0015】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAを含む配列は、標的RNA配列に特異的に結合するスパーサー配列をさらに含む。一部の実施形態では、スパーサー配列は、標的RNA配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、87%、90%、95%、97%、99%またはその間の任意のパーセンテージの相補性を有する。一部の実施形態では、スパーサー配列は、標的RNA配列に対して100%の相補性を有する。一部の実施形態では、スパーサー配列は、20ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、スパーサー配列は、21ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、スパーサー配列は、配列 C U G (配列番号 18)、C C U G (配列番号 19)、C A G (配列番号 80)、G G G G C C (配列番号 81) またはこれらの任意の組合せの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つのリピートを含む配列を含むまたはそれからなる。

【0016】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAを含む配列は、第1のRNA結合性タンパク質に特異的に結合する足場配列をさらに含む。一部の実施形態では、足場配列は、ステムループ構造を含む。一部の実施形態では、足場配列は、90ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、足場配列は、93ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、足場配列は、配列 G U U U A A G A G C U A U G C U G G A A A C A G C A U A G C A A G U U U A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C U U U U U U U (配列番号 13) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、足場配列は、配列 G G A C A G C A U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C U U U U U U (配列番号 17) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、足場配列は、配列

【化2】

G U U U A A G A G C U A U G C U G G A A A C A G C A U A G C A A G U U U A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C U U U U U U U (配列番号 82) または G U U U U A G A G C U A G A A A U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C U U U U U U U (配列番号 83)

を含むまたはそれからなる。

【0017】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAは、RNA分子内の第2の配列に結合しないまたは選択的には結合しない。

【0018】

本開示の組成物の一部の実施形態では、RNAゲノムまたはRNAトランスクリプトームは、RNA分子を含む。

【0019】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、C R I S P R - C a s タンパク質を含む。一部の実施形態では、C R I S P R - C a s タンパク質は、I I型C R I S P R - C a s タンパク質である。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、C a s 9ポリペプチドまたはそのRNA結合性部分を含む。一部の実施形態では、C R I S P R - C a s タンパク質は、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性を含む。一部の実施形態では、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性は、低下しているまたは阻害されている。一部の実施形態では、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性は、増

10

20

30

40

50

加しているまたは誘導されている。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、ネイティブなDNAヌクレアーゼ活性を含み、ネイティブなDNAヌクレアーゼ活性は阻害されている。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、変異を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質のヌクレアーゼドメインは、変異を含む。一部の実施形態では、変異は、CRISPR-Casタンパク質をコードする核酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、CRISPR-Casタンパク質をコードするアミノ酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、置換、挿入、欠失、フレームシフト、逆位、または転位を含む。一部の実施形態では、変異は、ヌクレアーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン内の結合性部位、ヌクレアーゼドメイン内の活性部位、またはヌクレアーゼドメイン内の少なくとも1つの必須アミノ酸残基の欠失を含む。

10

【0020】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、CRISPR-Casタンパク質を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、V型CRISPR-Casタンパク質である。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、Cpf1ポリペプチドまたはそのRNA結合性部分を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性を含む。一部の実施形態では、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性は、低下しているまたは阻害されている。一部の実施形態では、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性は、増加しているまたは誘導されている。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、ネイティブなDNAヌクレアーゼ活性を含み、ネイティブなDNAヌクレアーゼ活性は阻害されている。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、変異を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質のヌクレアーゼドメインは、変異を含む。一部の実施形態では、変異は、CRISPR-Casタンパク質をコードする核酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、CRISPR-Casタンパク質をコードするアミノ酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、置換、挿入、欠失、フレームシフト、逆位、または転位を含む。一部の実施形態では、変異は、ヌクレアーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン内の結合性部位、ヌクレアーゼドメイン内の活性部位、またはヌクレアーゼドメイン内の少なくとも1つの必須アミノ酸残基の欠失を含む。

20

【0021】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、CRISPR-Casタンパク質を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、VI型CRISPR-Casタンパク質である。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、Cas13ポリペプチドまたはそのRNA結合性部分を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、CasRx/Cas13dポリペプチドまたはそのRNA結合性部分を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性を含む。一部の実施形態では、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性は、低下しているまたは阻害されている。一部の実施形態では、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性は、増加しているまたは誘導されている。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、ネイティブなDNAヌクレアーゼ活性を含み、ネイティブなDNAヌクレアーゼ活性は阻害されている。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、変異を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質のヌクレアーゼドメインは、変異を含む。一部の実施形態では、変異は、CRISPR-Casタンパク質をコードする核酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、CRISPR-Casタンパク質をコードするアミノ酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、置換、挿入、欠失、フレームシフト、逆位、または転位を含む。一部の実施形態では、変異は、ヌクレアーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン内の結合性部位、ヌクレアーゼドメイン内の活性部位、またはヌクレアーゼドメイン内の少なくとも1つの必須アミノ酸残基の欠失を含む。

30

40

【0022】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、Pumil

50

i o および F B F (P U F) タンパク質を含むまたはその R N A 結合性部分を含む。一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、P u m i l i o に基づくアセンブリ (P U M B Y) タンパク質を含むまたはその R N A 結合性部分を含む。

【 0 0 2 3 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、R N A 結合活性のために多量体形成を必要としない。一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、多量体複合体の単量体ではない。一部の実施形態では、多量体タンパク質複合体は、第 1 の R N A 結合性タンパク質を含まない。

【 0 0 2 4 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、R N A 分子内の標的配列に選択的に結合する。一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、R N A 分子内の第 2 の配列に対する親和性を含まない。一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、R N A 分子内の第 2 の配列に対して高い親和性を含まずそれに選択的に結合しない。

10

【 0 0 2 5 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、R N A ゲノムまたは R N A トランスクリプトームは、R N A 分子を含む。

【 0 0 2 6 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、終点を含めて、2 アミノ酸から 1 3 0 0 アミノ酸の間を含む。

20

【 0 0 2 7 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質をコードする配列は、核局在化シグナル (N L S)、核外輸送シグナル (N E S) またはタグをコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、核局在化シグナル (N L S) をコードする配列は、第 1 の R N A 結合性タンパク質をコードする配列に対して 3 ' 側に位置する。一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、C 末端に N L S を含む。

【 0 0 2 8 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質をコードする配列は、第 1 の N L S をコードする第 1 の配列および第 2 の N L S をコードする第 2 の配列をさらに含む。一部の実施形態では、第 1 の N L S をコードする配列または第 2 の N L S をコードする配列は、第 1 の R N A 結合性タンパク質をコードする配列に対して 3 ' 側に位置する。一部の実施形態では、第 1 の R N A 結合性タンパク質は、C 末端に第 1 の N L S または第 2 の N L S を含む。

30

【 0 0 2 9 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、ヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、R N A と会合する様式で R N A に結合する。一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、R N A を切断する様式で R N A と会合する。

【 0 0 3 0 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質をコードする配列は、R N A s e を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、R N A s e 1 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R N A s e 1 は、配列番号 2 0 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、R N A s e 4 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R N A s e 4 は、配列番号 2 1 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、R N A s e 6 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R N A s e 6 は、配列番号 2 2 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、R N A s e 7 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R N A s e 7 は、配列番号 2 3 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、R N A s e 8 を含むまたはそれからなる。一部の実施形

40

50

態では、RNAse 8 タンパク質は、配列番号 24 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNAse 2 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse 2 タンパク質は、配列番号 25 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNAse 6 PL を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse 6 PL タンパク質は、配列番号 26 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNAse L を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse L タンパク質は、配列番号 27 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNAse T 2 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse T 2 タンパク質は、配列番号 28 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNAse 11 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse 11 タンパク質は、配列番号 29 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNAse T 2 様を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse T 2 様タンパク質は、配列番号 30 を含むまたはそれからなる。

10

20

30

40

50

【0031】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 RNAse を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 Rnase 1 (Rnase 1 (K41R)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase 1 (K41R) ポリペプチドは、配列番号 116 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 Rnase 1 (Rnase 1 (K41R、D121E)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase 1 (Rnase 1 (K41R、D121E)) ポリペプチドは、配列番号 66 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 Rnase 1 (Rnase 1 (K41R、D121E、H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase 1 (Rnase 1 (K41R、D121E、H119N)) ポリペプチドは、配列番号 118 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 Rnase 1 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 Rnase 1 (Rnase 1 (H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase 1 (Rnase 1 (H119N)) ポリペプチドは、配列番号 119 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 Rnase 1 (Rnase 1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase 1 (Rnase 1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)) ポリペプチドは、配列番号 120 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 Rnase 1 (Rnase 1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase 1 (Rnase 1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N、K41R、D121E)) ポリペプチドは、配列番号 121 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 Rnase 1 (Rnase 1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase 1 (Rnase 1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D)) ポリペプチドは、配列番号 122 を含むまたはそれからなる。

【0032】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、NOB 1 ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、NOB 1 ポリペプチドは、配列番号 31 を含むまたはそれからなる。

【 0 0 3 3 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼV (ENDOV)を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ENDOVタンパク質は、配列番号32を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼG (ENDOG)を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ENDOGタンパク質は、配列番号33を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼD1 (ENDOD1)を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ENDOD1タンパク質は、配列番号34を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヒトフラップエンドヌクレアーゼ-1 (hFEN1)を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hFEN1タンパク質は、配列番号35を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、DNA修復エンドヌクレアーゼXPF (ERCC4)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ERCC4タンパク質は、配列番号64を含むまたはそれからなる。

10

【 0 0 3 4 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼIII様タンパク質1 (NTHL)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、NTHLポリペプチドは、配列番号123を含むまたはそれからなる。

20

【 0 0 3 5 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヒトSchlafen14 (hSLFN14)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hSLFN14ポリペプチドは、配列番号36を含むまたはそれからなる。

【 0 0 3 6 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヒトベータ-ラクタマーゼ様タンパク質2 (hLACTB2)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hLACTB2ポリペプチドは、配列番号37を含むまたはそれからなる。

30

【 0 0 3 7 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、脱プリン/脱ピリミジン (AP) エンドデオキシリボヌクレアーゼ (APEX) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、脱プリン/脱ピリミジン (AP) エンドデオキシリボヌクレアーゼ (APEX2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、APEX2ポリペプチドは、配列番号38を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、APEX2ポリペプチドは、配列番号39を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、脱プリンまたは脱ピリミジン部位リアーゼ (APEX1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、APEX1ポリペプチドは、配列番号125を含むまたはそれからなる。

40

【 0 0 3 8 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、アンジオゲニン (ANG) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ANGポリペプチドは、配列番号40を含むまたはそれからなる。

【 0 0 3 9 】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、熱応答性タンパク質12 (HRSP12) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、HRSP12ポリペプチドは、配列番号41を含むまたはそれからなる。

【 0 0 4 0 】

50

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ジンクフィンガーCCC H型含有12A(ZC3H12A)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ZC3H12Aポリペプチドは、配列番号42を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ZC3H12Aポリペプチドは、配列番号43を含むまたはそれからなる。

【0041】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、反応性中間体イミンデアミナーゼA(RIDA)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RIDAポリペプチドは、配列番号44を含むまたはそれからなる。

【0042】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ホスホリパーゼDファミリーメンバー6(PDL6)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、PDL6ポリペプチドは、配列番号126を含むまたはそれからなる。

【0043】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ミトコンドリアリボヌクレアーゼP触媒サブユニット(KIAA0391)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、KIAA0391ポリペプチドは、配列番号127を含むまたはそれからなる。

【0044】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、アルゴノート2(AGO2)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。本開示の組成物の一部の実施形態では、AGO2ポリペプチドは、配列番号128を含むまたはそれからなる。

【0045】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ミトコンドリアヌクレアーゼEXO G(EXO G)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、EXO Gポリペプチドは、配列番号129を含むまたはそれからなる。

【0046】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ジンクフィンガーCCC H型含有12D(ZC3H12D)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ZC3H12Dポリペプチドは、配列番号130を含むまたはそれからなる。

【0047】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、小胞体から核へのシグナル伝達2(ERN2)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ERN2ポリペプチドは、配列番号131を含むまたはそれからなる。

【0048】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ペロタmRNAサーベイランスおよびリボソームレスキュー因子(PELO)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、PELOポリペプチドは、配列番号132を含むまたはそれからなる。

【0049】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、YBEYメタロペプチダーゼ(YBEY)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、YBEYポリペプチドは、配列番号133を含むまたはそれからなる。

【0050】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、切断およびポリアデニル化特異的因子4様(CPSF4L)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、CPSF4Lポリペプチドは、配列番号134を含むまたはそれからなる。

【0051】

10

20

30

40

50

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、hCG__2002731ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hCG__2002731は、配列番号135を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hCG__2002731ポリペプチドは、配列番号136を含むまたはそれからなる。

【0052】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、除去修復交差相補群1(ERCC1)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ERCC1ポリペプチドは、配列番号137を含むまたはそれからなる。

【0053】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ras関連C3ポツリヌス毒素基質1アイソフォーム(RAC1)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RAC1ポリペプチドは、配列番号138を含むまたはそれからなる。

【0054】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、リボヌクレアーゼAA1(RAA1)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RAA1ポリペプチドは、配列番号139を含むまたはそれからなる。

【0055】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、Ras関連タンパク質(RAB1)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RAB1ポリペプチドは、配列番号140を含むまたはそれからなる。

【0056】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、DNA複製ヘリカーゼ/ヌクレアーゼ2(DNA2)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、DNA2ポリペプチドは、配列番号141を含むまたはそれからなる。

【0057】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、FLJ35220ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、FLJ35220ポリペプチドは、配列番号142を含むまたはそれからなる。

【0058】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、FLJ13173ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、FLJ13173ポリペプチドは、配列番号143を含むまたはそれからなる。

【0059】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、テニユーリン膜貫通タンパク質(TENM)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、テニユーリン膜貫通タンパク質1(TENM1)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、TENM1ポリペプチドは、配列番号144を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、テニユーリン膜貫通タンパク質2(TENM2)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、TENM2ポリペプチドは、配列番号145を含むまたはそれからなる。

【0060】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、リボヌクレアーゼカッパ(RNAseK)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAseKポリペプチドは、配列番号204を含むまたはそれからなる。

【0061】

一部の実施形態では、本開示の融合タンパク質を、処置することを必要とする対象を処置するための方法であって、標的RNAを融合タンパク質または融合タンパク質をコードする配列と接触させることを含む方法において使用する。

10

20

30

40

50

【0062】

本特許または出願のファイルは、カラーで製作された少なくとも1つの図面を含有する。カラーの図面（複数可）を伴う本特許または特許出願公開のコピーは、要請し、必要な料金を支払えば、特許庁により提供される。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】図1A～Bは、本開示の組成物の例示的な実施形態の概略図である。（A）エンドヌクレアーゼと融合したRNA標的化Cas9系は、疾患を引き起こすRNAを標的とし、それを切断する。（B）エンドヌクレアーゼと融合したRNA標的化Cas9系がCUG単位のリピートで構成される反復RNAを標的とし、それを切断する、筋強直性ジストロフィー1型の状況での（A）の適用を示す。RNA標的化Cas9系の非存在下では、CUG単位のリピートで構成される反復RNAは、スプライシング因子MBNLに結合し、機能障害性RNAスプライシングによる病変を引き起こす。この反復RNAの切断により、疾患が好転する。

10

【0064】

【図2】図2は、RNA分子を標的とすることによって遺伝子疾患を処置するための例示的なモジュラー治療プラットフォームを示す概略図である。

【0065】

【図3】図3A～Bは、（A）RNAエンドヌクレアーゼ/Cas9融合物の発現を駆動するサイトメガロウイルスプロモーターを含む2つのプラスミド系を含む「高発現」対照系（「pos control」とも称される）および（B）RNAエンドヌクレアーゼ/Cas9融合物の発現を駆動する低発現プロモーター（pEFS）を含む単一のプラスミド系を含む「低発現」対照系（「P13」とも称される）を示す概略図の対である。

20

【0066】

【図4A】図4Aは、例示的なRNAエンドヌクレアーゼ-C.jejuni Cas9融合タンパク質（左）および例示的なRNAエンドヌクレアーゼ-S.pyogenes Cas9融合タンパク質を含むベクター（右）を示す概略図の対である。

【0067】

【図4B】図4Bは、図4Aに示されているC.jejuni Cas9またはS.pyogenes Cas9のいずれかを含む種々の融合タンパク質の、反復RNA分子を切断する能力を示すグラフである。

30

【0068】

【図5A】図5Aは、例示的なRNAエンドヌクレアーゼ-C.jejuni Cas9融合タンパク質（左）および例示的なRNAエンドヌクレアーゼ-S.pyogenes Cas9融合タンパク質を含むベクター（右）を示す概略図の対である。

【0069】

【図5B】図5Bは、図5Aに示されているC.jejuni Cas9またはS.pyogenes Cas9のいずれかを含む種々の融合タンパク質の、ルシフェラーゼタンパク質をコードするmRNA分子を切断する能力を示すグラフである。

40

【0070】

【図6】図6は、図4B、図5B、および図9に示されているエンドヌクレアーゼの略語一覧（key）を提示する表である。

【0071】

【図7A】図7Aは、例示的なRNAエンドヌクレアーゼ-C.jejuni Cas9融合タンパク質を示す概略図である。

【0072】

【図7B】図7Bは、表2に示されている種々のNS5標的化スペーサー配列を含有するsgRNAを有するE43 CjeCas9-エンドヌクレアーゼ融合物の存在下およびE67 CjeCas9-エンドヌクレアーゼ融合物の存在下の両方でのZika NS5の発現レベルの変化を示すグラフである。Zika NS5発現が、対照（ラムダ）ス

50

ペーサー配列を含有する sgRNA が負荷されたエンドヌクレアーゼと比べた倍率変化として示されている。

【0073】

【図8A】図8Aは、Zika NS5 標的化スペーサー配列を含有する sgRNA を負荷した Cjecas9 - エンドヌクレアーゼ融合物をトランスフェクトした細胞の蛍光顕微鏡画像である。

【0074】

【図8B】図8Bは、適当な Zika NS5 標的化 sgRNA を負荷した Cjecas9 - エンドヌクレアーゼ融合物の存在下での、非 Zika NS5 標的化 sgRNA を負荷した Cjecas9 - エンドヌクレアーゼ融合物と比較した Zika NS5 の発現の変化を示すグラフである。

10

【0075】

【図9】図9は、種々の例示的な融合タンパク質（アノテートされたエンドヌクレアーゼと融合した Spycas9）の切断効率を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0076】

本開示は、RNA 分子に選択的に結合し、必要に応じてそれを切断する、RNA によりガイドされる融合タンパク質を提供する。本開示は、RNA によりガイドされる融合タンパク質を含むベクター、組成物および細胞を提供する。本開示は、本開示の RNA によりガイドされる融合タンパク質、ベクター、組成物および細胞を使用して、疾患または障害を処置する方法を提供する。

20

ガイド RNA

【0077】

ガイド RNA (gRNA) という用語と単一ガイド RNA (sgRNA) という用語は、本開示全体を通して互換的に使用される。

【0078】

本開示のガイド RNA (gRNA) は、スペーサー配列および足場配列で構成され得る。一部の実施形態では、ガイド RNA は、連続したスペーサー配列および足場配列を含む単一ガイド RNA (sgRNA) である。一部の実施形態では、スペーサー配列と足場配列は連続していない。一部の実施形態では、足場配列は、「ダイレトリピート」(DR) 配列を含む。DR 配列は、スペーサー配列が散在する、CRISPR 遺伝子座 (細菌ゲノムまたはプラスミドに天然に存在する) 内の反復配列を指す。関連する CRISPR 遺伝子座の配列が分かっている場合には、対応する Cas タンパク質の DR 配列を推測することができることが周知である。一部の実施形態では、本開示のガイド RNA または単一ガイド RNA をコードする配列は、リンカー配列によって分離されたスペーサー配列と足場配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、リンカー配列は、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、15 個、20 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個またはその間の任意の数のヌクレオチドを含み得るまたはそれからなり得る。一部の実施形態では、リンカー配列は、少なくとも 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、15 個、20 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個またはその間の任意の数のヌクレオチドを含み得る。

30

40

【0079】

本開示のガイド RNA (gRNA) は、天然に存在しないヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、本開示のガイド RNA またはガイド RNA をコードする配列は、改変または合成された RNA ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。例示的な改変された RNA ヌクレオチドとしては、これだけに限定されないが、プソイドウリジン ()、ジヒドロウリジン (D)、イノシン (I)、および 7 - メチルグアノシン (m7G)、ヒポキサンチン、キサンチン、キサントシン、7 - メチルグアニン、5、6 - ジヒドロウラシル、5 - メチルシトシン、5 - メチルシチジン、5 - ヒドロキシメチルシトシン (hydropxy methylcytosine)、イソグアニン、およびイソシトシンが挙げられる。

50

【0080】

本開示のガイドRNA (gRNA) は、標的配列内の改変されたRNAに結合し得る。本開示のガイドRNA (gRNA) は、標的配列内の改変されたRNAに結合し得る。例示的なエピジェネティックにまたは転写後に改変されたRNAとしては、これだけに限定されないが、2'-O-メチル化(2'-OMe) (リボース部分の遊離の2'-OHの酸素に存在する2'-O-メチル化)、N6-メチルアデノシン(m6A)、および5-メチルシトシン(m5C)が挙げられる。

【0081】

本開示の組成物の一部の実施形態では、本開示のガイドRNAは、非コードC/Dボックス核小体低分子RNA (snRNA) 配列をコードする少なくとも1つの配列を含む。一部の実施形態では、snRNA配列は、標的RNAと相補的である少なくとも1つの配列を含み、ここで、RNA分子の標的配列は、少なくとも1つの2'-OMeを含む。一部の実施形態では、snRNA配列は、標的RNAと相補的である少なくとも1つの配列を含み、ここで、標的RNAと相補的である少なくとも1つの配列は、ボックスCモチーフ(RUGAUGA)およびボックスDモチーフ(CUGA)を含む。

10

【0082】

本開示のスペーサー配列は、RNA分子の標的配列に結合する。本開示のスペーサー配列は、CRISPR RNA (crRNA) を含み得る。本開示のスペーサー配列は、RNA分子の標的配列に対して十分な相補性を有して前記標的配列に選択的に結合する配列を含むまたはそれからなる。RNA分子の標的配列に結合すると、スペーサー配列は、足場配列および融合タンパク質の1つまたは複数をRNA分子へガイドする。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列に対して十分な相補性を有して前記標的配列に選択的に結合する配列は、標的配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはその間の任意のパーセンテージ同一性を有する。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列に対して十分な相補性を有して前記標的配列に選択的に結合する配列は、標的配列に対して100%の同一性を有する。

20

【0083】

本開示の足場配列は、本開示の第1のRNA結合性ポリペプチドに結合する。本開示の足場配列は、トランス作用性RNA (tracrRNA) を含み得る。本開示の足場配列は、RNA分子の標的配列に対して十分な相補性を有して前記標的配列に選択的に結合する配列を含むまたはそれからなる。RNA分子の標的配列に結合すると、足場配列は、融合タンパク質をRNA分子へガイドし得る。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列に対して十分な相補性を有して前記標的配列に選択的に結合する配列は、標的配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはその間の任意のパーセンテージ同一性を有する。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列に対して十分な相補性を有して前記標的配列に選択的に結合する配列は、標的配列に対して100%の同一性を有する。その代わりに、またはそれに加えて、一部の実施形態では、本開示の足場配列は、本開示の融合タンパク質の第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に結合する配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の足場配列は、二次構造または三次構造を含む。例示的な二次構造としては、これだけに限定されないが、ヘリックス、ステムループ、バルジ、テトラループおよびシュードノットが挙げられる。例示的な三次構造としては、これだけに限定されないが、A形態のヘリックス、B形態のヘリックス、およびZ形態のヘリックスが挙げられる。例示的な三次構造としては、これだけに限定されないが、ねじれたまたはらせん状になったステムループが挙げられる。例示的な三次構造としては、これだけに限定されないが、ねじれたまたはらせん状になったシュードノットが挙げられる。一部の実施形態では、本開示の足場配列は少なくとも1つの二次構造または少なくとも1つの三次構造を含む。一部の実施形態では、本開示の足場配列は、1つまたは複数の二次構造または1つまたは複数の三次構造を含む。

30

40

50

【0084】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、本開示のRNA分子内のテトラループモチーフに選択的に結合する。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、テトラループモチーフを含む。一部の実施形態では、テトラループモチーフは、GAAA、GUGA、GCAAまたはGAGAである配列の1つまたは複数を含むまたはそれからなる「GRNA」モチーフである。

【0085】

本開示の組成物の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列に結合するガイドRNAまたはその一部は、RNA分子の標的配列とハイブリダイズする。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に結合するガイドRNAまたはその一部は、第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に共有結合により結合する。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に結合するガイドRNAまたはその一部は、第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に非共有結合により結合する。

10

【0086】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、終点を含めて、10個から100個の間のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、終点を含めて、10個から30個の間のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個または30個のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、20ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、21ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の足場配列は、終点を含めて、10個から100個の間のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の足場配列は、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、76個、80個、87個、90個、95個、100個またはその間の任意の数のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の足場配列は、終点を含めて、85個から95個の間のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の足場配列は、85ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の足場配列は、90ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の足場配列は、93ヌクレオチドを含むまたはそれからなる。

20

30

【0087】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、核局在化配列(NLS)を含まない。

【0088】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と相補的な配列を含まない。

【0089】

本開示の治療用組成物または医薬組成物は、PAMmerオリゴヌクレオチドを含まない。他の実施形態では、必要に応じて、非治療用組成物または非医薬組成物は、PAMmerオリゴヌクレオチドを含み得る。「PAMmer」という用語は、ガイドヌクレオチド配列プログラマブルRNA結合性タンパク質と相互作用することができるPAM配列を含むオリゴヌクレオチドを指す。PAMmerの非限定的な例は、参照により本明細書に組み込まれるO'Connell et al. Nature 516, pages 263-266 (2014)に記載されている。PAM配列は、約2~約10個のヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフを指す。PAM配列は、それらが相互作用するガイドヌクレオチド配列プログラマブルRNA結合性タンパク質に対して特異的であり、また、当技術分野で公知である。例えば、Streptococcus pyogenes PAMは、配列5'-NGG-3'

40

50

を有し、ここで、「N」は、任意の核酸塩基であり、その後、2つのグアニン（「G」）核酸塩基が続く。Francisella novicidaのCas9は、標準的なPAM配列5'-NGG-3'を認識するが、PAM5'-YG-3'（「Y」はピリミジンである）を認識するように操作されており、したがって、可能なCas9標的の範囲を増加させる。Francisella novicidaのCpf1ヌクレアーゼは、5'-TTTN-3'または5'-YTN-3'であるPAMを認識する。

【0090】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、プロトスペーサーランキン配列（PFS）と相補的な配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部がPFSと相補的な配列を含むものを含め、第1のRNA結合性タンパク質は、Cas13タンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含み得る。一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部がPFSと相補的な配列を含むものを含め、第1のRNA結合性タンパク質は、Cas13タンパク質またはそのRNA結合性部分をコードする配列を含み得る。一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、PFSと相補的な配列を含まない。

10

【0091】

本開示の組成物の一部の実施形態では、本開示のガイドRNA配列は、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーター配列を含む。一部の実施形態では、本開示のガイドRNA配列を含むベクターは、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーター配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーターは、構成的プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列は、誘導性プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列（the promoter is a sequence）は、組織特異的かつ/または細胞型特異的プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ハイブリッドまたは組換えプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ガイドRNAを哺乳動物細胞において発現させることができるプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ガイドRNAをヒト細胞において発現させることができるプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ガイドRNAを発現させ、ガイドRNAを細胞の核に制限することができるプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトRNAポリメラーゼプロモーターまたはヒトRNAポリメラーゼプロモーターをコードする配列から単離されたもしくはそれに由来する配列である。一部の実施形態では、プロモーターは、U6プロモーターまたはU6プロモーターをコードする配列から単離されたもしくはそれに由来する配列である。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトtRNAプロモーターまたはヒトtRNAプロモーターをコードする配列から単離されたもしくはそれに由来する配列である。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトバリンtRNAプロモーターまたはヒトバリンtRNAプロモーターをコードする配列から単離されたもしくはそれに由来する配列である。

20

30

【0092】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーターは、調節エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーター配列を含むベクターは、調節エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、ガイドRNAの発現を増強するものである。例示的な調節エレメントとしては、これだけに限定されないが、エンハンサーエレメント、イントロン、エクソン、またはこれらの組合せが挙げられる。

40

【0093】

本開示の組成物の一部の実施形態では、本開示のベクターは、ガイドRNAをコードする配列、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーター配列および調節エレメントをコードする配列のうちの一つまたは複数を含む。本開示の組成物の一部の実施形態では、ベクターは、本開示の融合タンパク質をコードする配列をさらに含む。

融合タンパク質

【0094】

50

本開示の融合タンパク質は、第1のRNA結合性タンパク質および第2のRNA結合性タンパク質を含む。一部の実施形態では、融合タンパク質をコードする配列に沿って、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、第2のRNA結合性タンパク質をコードする配列に対して5'側に位置する。一部の実施形態では、融合タンパク質をコードする配列に沿って、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、第2のRNA結合性タンパク質をコードする配列に対して3'側に位置する。

【0095】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に結合することができるタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に選択的に結合することができ、DNA分子には結合しない、哺乳動物DNA分子には結合しない、またはいかなるDNA分子にも結合しないタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に結合し、RNA分子の破壊(break)を誘導することができるタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に結合し、RNA分子の破壊を誘導することができ、DNA分子には結合しない、哺乳動物DNA分子には結合しない、またはいかなるDNA分子にも結合しないタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に結合し、RNA分子の破壊を誘導することができ、DNA分子には結合せず、その破壊も誘導しない、哺乳動物DNA分子には結合せず、その破壊も誘導しない、または、いかなるDNA分子にも結合せず、その破壊も誘導しないタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。

10

20

【0096】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、DNAヌクレアーゼ活性を有さないタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。

【0097】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、DNAヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であって、本開示の組成物をRNA分子と接触させるかまたは本開示の細胞もしくは対象に導入したときにDNAヌクレアーゼ活性によりDNA分子の破壊が誘導されない、哺乳動物DNA分子の破壊が誘導されない、またはいかなるDNA分子の破壊も誘導されない、タンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。

30

【0098】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、DNAヌクレアーゼ活性を有するタンパク質であって、DNAヌクレアーゼ活性が不活化されており、本開示の組成物をRNA分子と接触させるかまたは本開示の細胞もしくは対象に導入したときにDNAヌクレアーゼ活性によりDNA分子の破壊が誘導されない、哺乳動物DNA分子の破壊が誘導されない、またはいかなるDNA分子の破壊も誘導されない、タンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、本開示の組成物をRNA分子と接触させるかまたは本開示の細胞もしくは対象に導入したときにDNAヌクレアーゼ活性によりDNA分子の破壊が誘導されない、哺乳動物DNA分子の破壊が誘導されない、またはいかなるDNA分子の破壊も誘導されないレベルまでDNAヌクレアーゼ活性を不活化するまたは低下させる変異を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、DNAヌクレアーゼ活性を不活化するまたは低下させる変異を含み、変異は、第1のRNA結合性タンパク質またはそのヌクレアーゼドメインをコードする核酸配列またはアミノ酸配列に対する置換、逆位、転位、挿入、欠失、またはこれらの任意の組合せのうちの1つまたは複数を含む。

40

50

【0099】

本開示の組成物の一部の実施形態では、本明細書に開示されるRNAによりガイドされる融合タンパク質の第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、CRISPR Casタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、CRISPR Casタンパク質は、II型CRISPR Casタンパク質を含む。一部の実施形態では、II型CRISPR Casタンパク質は、Cas9タンパク質を含む。本開示の例示的なCas9タンパク質は、これだけに限定されないが、細菌または古細菌を含めた、任意の種から単離され得るまたはそれに由来し得る。本開示の例示的なCas9タンパク質は、これだけに限定されないが、*Streptococcus pyogenes*、*Haloferax mediteranii*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Francisella tularensis* subsp. *novicida*、*Pasteurella multocida*、*Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejune*、*Streptococcus thermophilus*、*Campylobacter lari* CF89-12、*Mycoplasma gallisepticum* str. F、*Nitratifractor saluginis* str. DSM 16511、*Parvibaculum lavamentivorans*、*Roseburia intestinalis*、*Neisseria cinerea*、*a Gluconacetobacter diazotrophicus*、*an Azospirillum B510*、*a Sphaerochaeta globus* str. *Budddy*、*Flavobacterium columnare*、*Fluviicola taffensis*、*Bacteroides coprophilus*、*Mycoplasma mobile*、*Lactobacillus farciminis*、*Streptococcus pasteurianus*、*Lactobacillus johnsonii*、*Staphylococcus pseudintermedius*、*Filifactor alocis*、*Treponema denticola*、*Legionella pneumophila* str. *Paris*、*Sutterella wadsworthensis*、*Corynebacter diphtherias*、*Streptococcus aureus*、および*Francisella novicida*を含めた、任意の種から単離し得るまたはそれに由来し得る。

10

20

30

【0100】

本開示の例示的な野生型*S. pyogenes* Cas9タンパク質は、アミノ酸配列
:

【化3】

1 MDKKYSIGLD IGTNSVGWAV ITDEYKVPSK KFKVLGNTDR HSIKKNLIGA LLFDSGETAE
 61 ATRLKRTARR RYTRRKNRIC YLQEIFSNEM AKVDDSFHR LEESFLVEED KKHERHPIFG
 121 NIVDEVAYHE KYPTIYHLRK KLVDSTDKAD LRLIYLALAH MIKFRGHFLI EGDINPDNSD
 181 VDKLFIQLVQ TYNQLFEENP INASGVDAKA ILSARLSKSR RLENLIAQLP GEKKNGLFGN
 241 LIALSLGLTP NFKSNFDLAE DAKLQLSKDT YDDDLNLLA QIGDQYADLF LAAKNLSDAI
 301 LLSDILRVNT EITKAPLSAS MIKRYDEHHQ DLTLKALVR QQLPEKYKEI FFDQSKNGYA
 361 GYIDGGASQE EFKYFIKPIL EKMDGTEELL VKLNREDLLR KQRTFDNGSI PHQIHLGELH
 421 AILRRQEDFY PFLKDNREKI EKILTRIPY YVGPLARGNS REAWMTRKSE ETITPWNFEE
 481 VVDKGASAQS FIERMTNFDK NLPNEKVLPK HSLLYEYFTV YNELTKVKYV TEGMRKPAFL
 541 SGEQKKAIVD LLFKTNRKVT VKQLKEDYFK KIECFDSVEI SGVEDRFNAS LGTYHDLLKI
 601 IKDKDFLDNE ENEDILEDIV LTLTLFEDRE MIEERLKTYA HLFDDKVMKQ LKRRRYTGWG
 661 RLSRKLINGI RDKQSGKTIL DFLKSDGFAN RNFMQLIHDD SLTFKEDIQK AQVSGQGDSL
 721 HEHIANLAGS PAIKKGILQT VKVDELVKV MGRHKPENIV IEMARENQTT QKGQKNSRER
 781 MKRIEEGIKE LGSQILKEHP VENTQLQNEK LYLQYQNGR DMYVDQELDI NRLSDYDVDH
 841 IVPQSFLKDD SIDNKVLTSS DKNRGKSDNV PSEEVVKKMK NYWRQLLNAK LITQRKFDNL
 901 TKAERGGLSE LDKAGFIKRO LVETROITKH VAQILDSRMN TKYDENDKLI REVKVITLKS
 961 KLVSDFRKDF QFYKREINN YHHAHDAYLN AVVGTALIKK YPKLESEFVY GDYKVYDVRK
 1021 MIAKSEQEIG KATAKYFFYS NIMNFFKTEI TLANGAIRKR PLIETNGETG EIVWDKGRDF
 1081 ATVRKVLSP QVNIVKKTVEV QTGGFSKESI LPKRNSDKLI ARKKDWDPPK YGGFDSPTVA
 1141 YSVLVVAKVE KGKSKKLKSV KELLGITIME RSSFEKNPID FLEAKGYKEV KKDIIKLPK
 1201 YSLFELENGR KRMLASAGEL QKGNELALPS KYVNFLYLAS HYEKLGKGSPE DNEQKQLFVE
 1261 QHKHYLDEII EQISEFSKRV ILADANLDKV LSAYNKHRDK PIREQAENII HLFTLTNLGA
 1321 PAAFKYFDTT IDRKRYTSTK EVLDATLIHQ SITGLYETRI DLSQLGGD (配列番号 147)

10

20

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0101】

ヌクレアーゼが不活化された *S. pyogenes* Cas9 タンパク質は、10 位の アスパラギン酸 (D) のアラニン (A) による置換および 840 位のヒスチジン (H) のアラニン (A) による置換を含み得る。本開示の例示的なヌクレアーゼが不活化された *S. pyogenes* Cas9 タンパク質は、アミノ酸配列 (D10A および H840A は太字で下線が引かれている) :

30

【化4】

1 MDKKYSIGLA IGTNSVGWAV ITDEYKVPSK KFKVLGNTDR HSIKKNLIGA LLFDSGETAE
 61 ATRLKRTARR RYTRRKNRIC YLQEIFSNEK AKVDDSEFFHR LEESFLVEED KKHERHPIFG
 121 NIVDEVAYHE KYPTIYHLRK KLVDSTDKAD LRLIYLALAH MIKFRGHFLI EGDLPDNDSD
 181 VDKLFIQLVQ TYNQLFEENP INASGVDAKA ILSARLSKSR RLENLIAQLP GEKKNGLFGN
 241 LIALSLGLTP NFKSNFDLAE DAKLQLSKDT YDDDLNLLA QIGDQYADLF LAAKNLSDAI
 301 LLSDILRVNT EITKAPLSAS MIKRYDEHHQ DLTLLKALVR QQLPEKYKEI FFDQSKNGYA
 361 GYIDGGASQE EFKYFIKPIL EKMDGTEELL VKLNREDLLR KQRTFDNGSI PHQIHLGELH
 421 AILRRQEDFY PFLKDNREKI EKILTRIPY YVGPLARGNS REAWMTRKSE ETITPWNFEE
 481 VVDKGASAQS FIERMTNFDK NLPNEKVLPK HSLLYEYFTV YNELTKVKYV TEGMRKPAFL
 541 SGEQKKAIVD LLFKTNRKVT VKQLKEDYFK KIECFDSVEI SGVEDRFNAS LGTYHDLLKI
 601 IKDKDFLDNE ENEDILEDIV LTLTLFEDRE MIEERLKYA HLFDDKVMKQ LKRRRYTGWG
 661 RLSRKLINGI RDKQSGKTIL DFLKSDGFAN RNFMQLIHDD SLTFKEDIQK AQVSGQGDSL
 721 HEHIANLAGS PAIKKGILQT VKVDELVKV MGRHKPENIV IEMARENQTT QKGQKNSRER
 781 MKRIEEGIKE LGSQILKEHP VENTQLQNEK LYLYLQNGR DMYVDQELDI NRLSDYDVDA
 841 IVPQSFLKDD SIDNKVLTNR DKNRGKSDNV PSEEVVKKMK NYWRQLLNAK LITQRKFDNL
 901 TKAERGGLSE LDKAGFIKRO LVETRQITKH VAQILDSRMN TKYDENDKLI REVKVITLKS
 961 KLVSDFRKDF QFYKREINN YHHAHDAYLN AVVGTALIKK YPKLESEFVY GDYKVYDVRK
 1021 MIAKSEQEIG KATAKYFFYS NIMNFFKTEI TLANGAIRKR PLIETNGETG EIVWDKGRDF
 1081 ATVRKVLSPM QVNIVKKTIV QTGGFSKESI LPKRNSDKLI ARKKDWDPPK YGGFDSPTVA
 1141 YSVLVVAKVE KGKSKLKSIV KELLGITIME RSSFEKNPID FLEAKGYKEV KKDIIKLPK
 1201 YSLFELENGR KRMLASAGEL QKGNELALPS KYVNFYLYAS HYEKLGKSPE DNEQKQLFVE
 1261 QHKHYLDEII EQISEFSKRV ILADANLDKV LSAYNKHRDK PIREQAENII HLFTLTNLGA
 1321 PAAFKYFDTT IDRKRYTSTK EVLDATLIHQ SITGLYETRI DLSQLGGD (配列番号 148)

10

20

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0102】

ヌクレアーゼが不活化された *S. pyogenes* Cas9 タンパク質は、RuvC
ヌクレアーゼドメインまたはその一部、HNHドメイン、DNAse 活性部位、
メタルフォールドまたはDNAse 活性部位を含むその一部またはこれらの任意の組合せ
の欠失を含み得る。

【0103】

他の例示的な Cas9 タンパク質またはその一部は、以下のアミノ酸配列を含み得る
またはそれからなり得る。

【0104】

一部の実施形態では、Cas9 タンパク質は、*S. pyogenes* Cas9 であり
得、アミノ酸配列：

【化5-1】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR
 YTRRKNRICYLQEIFSNEKAKVDDSEFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV
 DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLPDNDSDVDKLFILVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSAR
 LSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNIALSLGLTPNFKSNFDLAEADAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQY
 ADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG

30

40

【化5 - 2】

YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYF
 FLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLP
 NEKVLPKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
 CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDK
 VMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
 GDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG
 IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT
 RSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
 KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLTKSKLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVGITALI
 KKYPKLESEFVYGDYKVVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG
 EIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
 YSVLVVAKVEKKGSKKLSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKR
 MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLLKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILAD
 ANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYE
 TRIDLSQLGGD (配列番号 149)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0105】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*S. aureus* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化6】

MKRNILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRHRHRIQRVKLLF
 DYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSK
 ALEEKYVAELQLERLKKDGEVRSINRFKTSYVKEAKQLLVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRYYEG
 PGEKSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYKQII
 ENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAKILTY
 QSSEDIQEELTNLSEL TQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVKQVDS
 QQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIE
 EIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFYEVVDHIIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEE
 NSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYA
 TRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDALIIANADFIFKEWKKLD
 KAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYSTRKD
 DKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHDPTQYQKLLIMEQYGDENPLYKYEEETGN
 YLTKYSKKNPVIKKIKYYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYPYFDVYLDNGVYKFTVKNLD
 VIKKENYEVNSKCYEEAKKLLKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYR VIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYL
 ENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG (配列番号 150)

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0106】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*S. thermophiles* CRISPR1 Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化7 - 1】

MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIHKNSRIFPAAQAENNLVRRRTNRQGRRLARRKKHRRVRLNRLFEE

【化 7 - 2】

SGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFIALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYQAIVKENS
 QLETKTPGQIQRLERYQTYGQLRGDFTVEKDGKHKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEFINRYLE
 ILTGKRKYHGPNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPPDEFRAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTV
 PTETKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLE
 TLDIEQMDRETLDKLAYVLTNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGWHNFSVKL
 MMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNPVVAKSVRQAIVNAAIKEYGDFD
 NIVIEMARETNEDEKKAIQKIQAANKDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQG
 ERCLYTGKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKQRTPYQALDSMDDAWSFRE
 LKAFVRESKTLNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRG
 QFTSQLRRHWGIEKTRDITYHHHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVF
 KAPYQHFVDTLKSKFEFDSILFSYQVDSKFNKISDATIYATRQAKVGKDADETYVLGKIKDIYTQDGYD
 AFMKIYKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPIENYPNKQINDKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGP
 EIKSLKYYDSKLGHNHIDITPKDSNNKVVLSVSPWRADVFNKTTGKYEILGLKYADLQFDKGTGTYKISQ
 EKYNDIKKKEGVSDSEFKFTLYKNDLLL VKDTETKEQQLFRFLSRTMPKQKHVELKPYDKQKFEGGEA
 LIKVLGNVANSQCKKGLGKSNISYKVRTDVLGNQHIIKNEGDKPKLDF (配列番号 151)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0107】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*N. meningitidis* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化 8】

MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEDENPICLIDLGVRFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLT
 RRAHRLLRARLLKREGVLQAADFENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLS
 QRKNEGETADKELGALLKGVADNAHALQTGDFRTPAELALNKFEEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAE
 ILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIEITLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAANKNTYTAERFIWLTCL
 NNLRIEQGSRPLTDERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAY
 HAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKQVQISL
 RRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQARKVINGVRRYRGSPAR
 IHETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKE
 INLGRLENEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETS
 RFPRSKKQRILLQKFDEDEGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGGKRVFASNGQITNLLRGFWGL
 RKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQ
 EVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRITLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAR
 LDEGVSVLRVPLTQLKLDLEKMNREREPPLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQVK
 AVRVEQVQKTGVVVRNHGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQKDEEDW
 QLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFYGFASCHRGTTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFKY
 QIDELGKEIRPCRLKRPV (配列番号 152)

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0108】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*Parvibaculum lavam
 entivorans* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化9】

MERIFGFDIGTTSIGFSVIDYSSTQSAGNIQRLGVRIFPEARDPDGTPLNQRRQKRMMRRQLRRRRIRRKAL
 NETLHEAGFLPAYGSADWPVVMADPEYELRRRGLEEGLSAYEFGRAIYHLAQHRHFKGRELEESDTPDPD
 VDDEKEAANERAATLKALKNEQTTLGAWLARRPPSDRKRGIHAHRNVVAEEFERLWEVQSKFHPALKSE
 EMRARISDTIFAQRPVFWRKNTLGEGRFMPGPELCPKGSWLSQQRMLKLNLAAGGNARPLDAEERD
 AILSKLQQQASMSWPGVRSALKALYKQRGEPGAEKSLKFNLELGGESKLLGNALAKLADMFGPDWPAH
 PRKQEIRHAVHERLWAADYGETPDKKRVIILSEKDRKAHREAAANSFVADFGITGEQAAQLQALKLPTGW
 EPYSIPALNLFLAELEKGERFGALVNGPDWEGWRRTNFPHRNQPTGEILDKLPSPASKEERERISQLRNPTV
 VRTQNELRKVVNNLIGLYGKPDRIEIVGRDVGKSKREREEIQSGIRRNEKQRKKATEDLIKNGIANPSRDD
 VEKWLWKEGQERCPYTGDIQGFNALFREGRYEVEHIWPRSRSFDNSPRNKTLCRKDVNIEKGNRMPFEAF
 GHDEDWWSAIQIRLQGMVSAKGGTGMSPGKVKRFLAKTMPEDFAARQLNDTRYAAKQILAQLKRLWPD
 MGPEAPVKVEAVTGQVTAQLRKLWTLNNILADDGEKTRADHRHHAIDALTVACTHPGMTNKLSTRYWQL
 RDDPRAEKPALTPPWDTIRADAEKAVSEIVVSHRVRKVKVSGPLHKETTYGDTGTDIKTKSGTYRQFVTRKK
 IESLSKGELDEIRDPRIKEIVAHVAGRGGPKKAFPPYPCVSPGGPEIRKVRILTQQLNLMAQTGNGYAD
 LGSNHIAIYRLPDGKADFEIVSLFDASRRLAQRNPVQRTRADGASFVMSLAAGEAIMIPEGSKKGIWIVQ
 GVVASGQVLERDADHSTTRPMPNPILKDDAKKVSIDPIGRVRPSND (配列番号 153)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0109】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*Corynebacter diphtheria* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化10】

MKYHVIGIDVGTFSVGLAAIEVDDAGMPIKTLVSHIHDSGLDPDEIKSAVTRLASSGIARRTRRLYRRKRR
 RLQQLDKFIQRQGWVIELEDYSDPLYPWKVRaelAASYIADEKERGEKLSVALRHIARHRGWRNPYAKV
 SSLYLPDGPSDAFKAIREEIKRASGQVPETATVGMVTLCELGTLKLRGEGGVL SARLQQSDYAREIQEIC
 RMQEIGQELYRKIIDVVFAAESPKGSASSRVGKDPLQPGKNRALKASDAFQRYRIAALIGNLVRVDGEKRI
 LSVEEKNLVFDHLVNLTPKKEPEWVTIAEILGIDRGQLIGTATMTDDGERAGARPPHTDNRISVNSRIAPL
 VDWWKTASALEQHAMVKALSNAEVDDFDSPEGAKVQAFFADLDDD VHAKLDSLHLPVGRAA YSEDTLV
 RLTRRMLSDGVLDYARLQEFIEPSWTPPTPRIGEPVGNPAVDRVLKTVSRWLESATKTWGAPERVIEHV
 REGFVTEKRAREMDGDMRRAARNALFQEMQEKLNVQGKPSRADLWRYQSVQRQNCQCAYCGSPITF
 SNSEMDHIVPRAGQGSTNTRENLA VCHRCNQSKGNTPFIAWAKNTSIEGVSVKEAVERTRHWVTDGTM
 RSTDFKKFTKAVVERFQRATMDEEIDARSMESVAWMANELRSRVAQHFAHGTTVRVYRGLTAEARRA
 SGISGKLKFFDGVGKSRLDRRHHAIDAAVIAFTSDYVAETLAVRSNLKQSQAHRQEAPQWREFTGKDAEH
 RAAWRVWCQKMEKLSALLTEDLRDDR VVMSNVRLRLGNGSAHKETIGKLSKVKLSSQLSVSDIDKASS
 EALWCALTRPGFDPKEGLPANPERHIRVNGTHVYAGDNIGLFPVSAGSIALRGGYAELGSSFHARVYKI
 TSGKKPAFAMLRVYTIDLLPYRNQDLFSVELKPQTMSMRQAEEKLRDALATGNAEYLGWL VVDEL VVD
 TSKIATDQVKA VEAE LGTIRRWV DGGFSPSKLRLRPLQMSKEGIKESAPELSKIIDRPGWLPV NKLFS D
 GNVTVVRRDSLGRVRL ESTAHL PVTWKVQ (配列番号 154)

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0110】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*Streptococcus pasteurianus* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化 1 1】

MTNGKILGLDIGIASVGVGIIIAKTGKVVHANSRLFSAANAENNAERRGFRGSRRLNRRKKHRVVRDLF
 EKYGIVTDFRNLNLPYELRVKGLTEQLKNEELFAALRTISKRRGISYLDDEDDSTGSTDYAKSIDENRRL
 LKNKTPGQIQLERLEKYGQLRGNFTVYDENGAEHRLINVFSTSDYEKEARKILETQADYNKKITAEFIDYV
 EILTQKRKYHGGPNEKSRDYGRFRTDGTTLENIFGILIGKCNFYPPDEYRASKASYTAQEYNFLNDLNNLK
 VSTETGKLSTEQKESLVEFAKNTATLGPALLKEIAKILDCKVDEIKGYREDDKGGKPDHFTFEPYRKLKFNL
 ESINIDDLREVIDKLADILTLNTEREGIEDAIKRNLPNQFTEEQISEIIVRKSQSTAFNKGWHSFSAKLMNE
 LIPELYATSDEQMTILTRLEKFKVNKSSKNTKTIDEKEVTDEIYNPVVAKSVRQTIKIINA AVKKYGDFDKI
 VIEMPRDKNADDEKFKIDKRKKNKKEKDDALKRAAYLYNSSDKLPDEVFHGNKQLETKIRLWYQQGER
 CLYSGKPISIQELVHNSNNFEIDHILPLSLSFDDSLANKVLVYAWTNQEKGGKTPYQVIDSMDAAWSFREM
 KDYVLKQKGLGKKRKYLLTTENIDKIEVKKKFIERNLVDTRYASRVVLSLQSLRELKDKTKVSVVRG
 QFTSQLRRKWKIDKSRETYHHHAVDALIIAASSQLKLWEKQDNPMFVDYGKNQVVDKQTGEILSVSDDEY
 KELVFQPPYQGFVNTISSKGFEDILFSYQVDSKYNRKVSDATYSTRKAKIGKDKKEETYVLGKIKDIYSQ
 NGFDTFIKKYNKDKTQFLMYQKDSLWENVIEVILRDYPTTKKSEDGKNDVKCNPFEEYRRENGLICKYSK
 KGGKTPIKSLKYDYKLGNCIDITPEESRNKVLQSNPWRADVYFNPETLKYELMGLKYSDDLSEFKGTGNY
 HISQEKYDAIKEKEGIGKKSEFKFTLYRNDLILIKDIASGEQEIYRFLSRTPMNVNHYVELKPYDKKFDNVQ
 ELVEALGEADKVGRCIKGLNKNPISYKVRTDVLGNKYFVKKKGDKPKLDFKNNK (配列番号 155)

10

20

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0 1 1 1】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*Neisseria cinerea* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化 1 2】

MAAFKPNPMNYILGLDIGIASVGVWAVEIDEEENPIRLIDLGVRFERAEVPGTGDSLAAARRLARSVRRLT
 RRRARHLLRARRLLKREGVLQAADFENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLS
 QRKNEGETADKELGALLKGVADNTHALQTGDFRTPAELALNKFEEKESGHIRNQRGDYSHTFNRKDLQAE
 NLLFEKQKEFGNPHVSDGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPTPKAAKNTYTAERFVWLT
 LNNLRILEQGSERPLDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLLDLDDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEK
 YHAISRALKEGLKDKKSPNLSPQLQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKQVQISL
 ALRRIVPLMEQGNRYDEACTEYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQARKVINGVVRRYGSP
 ARIHIETAREVGSFKDRKEIEKRQEENRKDREKSAKFREYFPNFVGEPKSKDILKRLRYEQQHKGKCLYSG
 KEINLGRLEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLALGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVE
 TSRFPRSKKQRILLQKFDEDFGKERNLNDTRYINRFLCQFVADHMLLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWG
 LRKVRANDRRHALLDAVVVACSTIAMQKQITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQAHPQPWEFFA
 QEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRLLAEKLSRPEAVHKYVTPLFISRAPNRKMSGQGHMETVKS
 AKRLDEGISVLRVPLTQLKLDLEKMNREPERKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQV
 KAVRVEVQVQKTGVVWHNHGIADNATIVRVDVFEKGGKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQKDEEDW
 TVMDDSFEFKFLYANDLIKLTAKKNEFLGYFVSLNRATGAIDIRTHDSTDSTKGKNGIFQSVGVKTALS
 FQKYQIDELGKEIRPCRLKRRPPVR (配列番号 156)

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0 1 1 2】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*Campylobacter lari* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化 1 3】

MRILGFDIGINSIGWAFVENDELKDCGVRIFTKAENPKNKESLALPRRNARSSRRRLKRRKARLIAIKRILAK
 ELKLNKYDYVAADGELPKAYEGSLASVYELRYKAL TQNLETKDLARVILHIAKHRGYMKNKNEKKSNDK
 KGKILSALKNNALKLENYQSVGEYFYKEFFQKYKKN TKNFIRNTKDNYN NCVLSSDLEKELKLILEKQK
 EFGYNYSEDFINEILKVAFFQRPLKDFSHLVGACTFFEEEEKRACKNSYSAWEFVALTKIINEIKSLEKISGEIV
 PTQTINEVLNLILDKGSITYKFRSCINLHESISFKSLKYDKENAENAKLIDFRKLVEFKKALGVHSLSRQEL
 DQISTHITLIKDNVCLKTVLEKYNSNEQINNLEIEFNDYINLSFKALGMILPLMREGKRYDEACEIANLKP
 KTVDEKKDFLPAFCDSIFAHELSNPVVNRAISEYRKVLNALLKKYGKVHKKIHELELARDVGLSKKAREKIEK
 EQKENQAVNAWALKECENIGLKASAKNILKLLWKEQKEICISGNKISIEHLKDEKALEVDHIYPYRSFSD
 DSFINKVLVFTKENQEKLNTPFPAFGKNIEKWSKIQTALQNLPHYKKNKILDENFKDKQQEDFISRNLNDT
 RYIATLIAKYTKEYLNFLLLSENENANLKSGEK GSKIHVQTISGMLTSVLRHTWGFDDKDRNNHLHHALDA
 IIVAYSTNSIIKAFSDFRKNQELLKARFYAKELTSDNYKHQVKFFEPFKSFREKILSKIDEIFVSKPPKRARR
 ALHKDTFHSENKIIDKCSYNSKEGLQIALSCGRVRKIGTKYVENDTIVRVDIFKKQNKFYAPIYAMDFALGI
 LPNKIVITGKDKNNNPKQWQTIDESYEFCSLYKNDLILLQKKNMQEPEFAYYNDFSISTSSICVEKHDNKF
 ENLTSNQKLLFSNAKEGSVKVESLGIQNLKVFKEYIITPLGDKIKADFQPRENISLKTSSKYGRL

10

(配列番号 157)

を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0 1 1 3】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*T. denticola* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化 1 4 - 1】

MKKEIKDYFLGLDVGTVGSVWAVTDTDYKLLKANRKDLWGMRCFETAETAEVRRLLHRGARRRIERRKK
 RIKLLQELFSQEIAKTDEGFFQRMKESPFYAEDKTILQENTLFNDKDFADKTYHKA YPTINHLIKAWIENKV
 KPDPRLLYLACHNIIKRGHFLFEGDFDSENQFDTSIQALFEYLREDMEVDIDADSQKVKELKDSLLKNS
 KQSRLNKILGLKPSDKQKKAITNLISGNKINFADLYDNPDLKDAEKNSISFSKDDFDALSDDLASILGDSFEL
 LLKAKAVYNCSVLSK VIGDEQYLSFAKVKIYEKHKTDLTKLKNVIKHFPPKDYKVFVGYNKNEKNNNNY
 SGYVGVCKTKSKLIINNSVNQEDFYKFLKTILSAKSEIKEVNDILTEIETGTFPKQISKSNAEIPYQLRKME
 LEKILSNAEKHFSFLKQKDEKGLSHSEKIIMLLTFKIPYIIGPINDNHKKFFPDRCWVVKKEKSPSGKTTPWN
 FFDHIDKEKTAEAFITSRNFCTYL VGESVLPKSSLLYSEYTVLNEINN LQIIIDGKNICDIKQKQIYEDLFKK
 YKKITQKQISTFIKHEGICNK TDEVII LGIDKECTSSLKSYIELKNIFGKQVDEISTKNMLEEIRWATIYDEGE
 GKTILKTKIKAEYGYCSDEQIKKILNLKFSGWGRLSRK FLETVTSEMPGFSEPVNIITAMRETQNNLMELLS
 SEFTFTENIKKINSGFEDA EKQFSYDGLVKPLFLSPSVKMLWQTLKLVKEISHITQAPPKKIFIEMAKGAEL
 EPARTKTRKILQDLYNCKNDADAFSSEIKDLSGKIENEDNLR LRSKLYLYYTQLGKCMYCGKPIEIGH
 VFDTSNYDIDHIYPQSKIKDDISISNRVLVCCSNKNKEDK YPLKSEIQSKQRGFWNFLQRNNFISLEKLNRLT
 RATPISDDETAKFARQLVETRQATKVAKVLEKMF PETKIVYSKAETVSMFRNKFDIVKCREINDFHHAH
 DAYLNIVVGNVYNTKFTNPNWNIKEKRDNPKIADTYNYYK VFDYDVKRNNITAWKGGKTIITVKDMLKR
 NTPYTRQAACKKGELFNQTIMKKGLGQHPLKKEGPFNSISKYGGYNKVSAAYYTLIEYEEKGNKIRSLETI

30

40

【化 1 4 - 2】

PLYLVKDIQKDQDVLKSYLTDLLGKKEFKILVPKIKINSLKINGFPCHITGKTNDSFLLRPAVQFCCSNNEV
 LYFKKIIRFSEIRSQREKIGKTI SPYEDLSFRSYIKENLWKKTKNDEIGEKEFYDLLQKKNLEIYDMLLTKHKD
 TIYKKRPNSATIDILVKGKEKFKSLIENQFEVILEILKLFSA TRNVSDLQHIGGSKYSGVAKIGNKISSLDNCI
 LIYQSITGIFEKRIDLKLV (配列番号 158)

を含み得るまたはそれからなり得る。

50

【 0 1 1 4 】

一部の実施形態では、C a s 9 タンパク質は、S . m u t a n s C a s 9 であり得、アミノ酸配列：

【 化 1 5 】

MKKPYSIGLDIGTNSVGWAVVTDYKVPACKMKVLGNTDKSHIEKNLLGALLFDSGNTAEDRRLKRTAR
 RRYTRRRNRILYLQEIFSEEMGKVDDSFHRLSDFLVTEKRGERHPIFGNLEEEVKYHENFPTIYHLRQYL
 ADNPEKVDLRLVYLALAHIIKFRGHFLIEGKFDTRNNDVQRLFQEFLLAVYDNTFENSSLQEONVQVEEILTD
 KISKSARKKDRVLKLPNEKSNRFAEFLKLIVGNQADFKKHFELEEKAPLQFSKDTYEEELVLLAQIGDNY
 AELFLSAKKLYDSILLSGILTVTDVGTAKPLSASMIQRYNEHQMDLAQLKQFIRQKLSDKYNEVFSQVSKD
 GYAGYIDGKTNQEFYKYKGLLNKIEGSGYFLDKIEREDFLRKQRTFDNGSIPHQIHLQEMRAIIRQAEF
 YPFLADNQRDRIKLLTFRIPYYVGPLARGKSDFAWLSRKSADKITPWNFDEIVDKESSAEAFINRMTNYDLY
 LPNQKVLPHSLLYEKFTVYNELTKVKYKTEQGKTAFFDANMKQEIFDGVFKVYRKVTKDKLMDLFLEKE
 FDEFRIVDLTGLDKENKVFNASYGTYHDLCKILDKDFLDNSKNEKILEDIVLTLTLFEDREMIRKLENYS
 LLTKEQVKKLERRHYTGWGRLSAELIHGIRNKESRKTILDYLIIDDGNSNRNFMQLINDDALSFKKEEIAKAQV
 IGETDNLNQVSDIAGSPAIIKGGILQSLKIVDELVKIMGHQPENIVVEMARENQFTNQGRNSQQLKGLTD
 SIKEFGSQILKEHPVENSQIQNDRLFLYYLQNGRDMYTGEELDIDYLSQYDIDHIIPQAFIKDNSIDNRVLTSS
 KENRGKSDDVPSKDVVRKMKSYWSKLLSAKLITQRKFDNLTKAERGGTTDDDKAGFIKRQLVETRQITKH
 VARILDERFNTETDENNKIRQVKIVTLKSNLVSNFRKEFELYKVRINDYHHAHDAYLNAVIGKALLGVY
 PQLEPEFVYGDYPHFHGHKENKATAKFFYSNIMNFFKDDVVRTDKNGEIIWKKDEHISNIKKVLSYPQVN
 IVKKVEEQTGGFSKESILPKGNSDKLIPRKTCKFYWDTKKYGGFDSPIVAYSILVIADIEKGKSKKLKTVKAL
 VGVTIMEKMTFERDPVAFLEKRGYRNVQEEINIKLPKYSLFKLENGRKRLLASARELQKGNIEIVLPNHLGT
 LLYHAKNIHKVDEPKHLDYVDKHKDEFKELLDVVSNFSSKKYTLAEGNLEKIKELYAQNNGEDLKECLASSFI
 NLLTFTAIGAPATFKFFDKNIDRKRYTSTTEILNATLIHQISITGLYETRIDLNKLGDD (配列番号 159)

10

20

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 1 5 】

一部の実施形態では、C a s 9 タンパク質は、S . t h e r m o p h i l u s C R I S P R 3 C a s 9 であり得、アミノ酸配列：

【 化 1 6 - 1 】

MTKPYSIGLDIGTNSVGWAVTTDNYKVPSSKMKVLGNTSKKYIKKNLLGVLLFDSGITAEGRRLKRTARR
 RYTRRRNRILYLQEIFSTEMATLDDAFFQLDDSFVLPDDKRDSDYPIFGNLVEEKAYHDEFPTIYHLRKYL
 ADSTKKADLRLVYLALAHMIKYRGHFLIEGFEFNSKNNDIQKNFQDFLDTYNAIFESDLSLENSKQLEEIVKD
 KISKLEKKDRILKLPGEKNSGIFSEFLKLIVGNQADFRKCFNLDEKASLHFSKESYDEDETLGLYIGDDYS
 DVFLKAKKLYDAILLGFVTDNETEAPLSSAMIKRYNEHKEDLALLKEYIRNLSLKYNEVFKDDTKNG
 YAGYIDGKTNQEDFYVYLKLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIPYQIHLQEMRAILDKQAKF
 YPFLAKNKERIEKILTFRIPYYVGPLARGNSDFAWSIRKRNEKITPWNFEDVIDKESSAEAFINRMTSFDLYL
 PEEKVLPKHSLLYETFNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSKQKKDIVRLYFKDKRKVTDKDIIEYLHAIYGY

40

【化16-2】

DGIELKGIEKQFNSSLSTYHDLNLIINDKEFLDDSSNEAIIIEIHTLTIFEDREMIKQRLSKFENIFDKSVLKKL
 SRRHYTGWGLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIDDGISNRNFMQLIHDDALSFKKKIQAQIIGDEDKGNIKE
 VVKSLPGSPAIIKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMARENQYTNQGKSNSQQLKRLEKSLKELGS
 KILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQNGKDMYTGDDLDIDRLSNYDIDHIIPQAFKDNSIDNKVLS
 SASNRGKSDDVPSLEVVKRRTFWYQLLKSLLISQRKFDNLTKAERGGLSPEDKAGFIQRQLVETRQITKH
 VARLLDEKFNNKCDENNRAVRTVKIITLSTLVSQFRKDFELYKREINDFHHAHDAYLNAVVASALLKK
 YPKLEPEFVYGDYPKYNFRERKSATEKVYFYNSNIMNIFKKSISLADGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDL
 ATVRRVLSYPQVNVVKKVEEQNHGLDRGKPKGLFNANLSSKPKPNSNENLVGAKEYLDPKKGYYAGIS
 NSFTVLVKGTIEKGAKKJITNVLEFQGISILDRINRDKDLNLFLEKGYKDIELIIEPKYSLFELSDGSRRL
 ASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFVKLLYHAKRISNTINENHRKYVENHKKEFEELFYIILEFNENYVGAK
 KNGKLLNSAFQSWQNHSIDELCSSFIGPTGSEKGLFELTSRGSAADEFGLGVKIPRYRDYTPSSLLKDATLI
 HQSVTGLYETRIDLAKLGEG (配列番号 160)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0116】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*C. jejuni* Cas9であり得、
 アミノ酸配列：

【化17】

MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIPTKVENPKTGESLALPRRLARSARKRLARRKARLNHLKHLI
 ANEFKLNIEDYQSFDESLAKAYKGLISPYELRFRALNELLSKQDFARVILHIARRGYDDIKNSDDKEKG
 AILKAIKQNEEKLANYSVGEYLYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIASFLKDELKLIKQREFG
 FSFSKFFEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIINLLNLKNTEGILYTK
 DDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFIEFKKYKEFIKALGEHNSQDDLNEIAKDI
 TLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPMLEGKKYDEACNELNLKVAINED
 KKDFLPAFNETYKDEVTNPVVLRAIKEYRKLNLALLKKYGVKHKINIELAREVGKNHSQRAKIEKEQNE
 NYKAKKDAELEEKGLKINSKNILKRLRFKEQKEFCAYSGEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSDSYM
 NKVLVFTKQNEKLNQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDR
 YIARLVNNTKDYLDLPLSDDENTKLNNTQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKDRNNHLHHAID
 AVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKP
 SGALHEETFRKEEFYQSYGGKEGVKALELGKIRKVNKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNFYAVPIYTM
 FALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYFCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYNAFTSSTVSLIVSKHD
 NKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFKEYIVSALGEVTKAEFRQREDFKK (配列番号 161)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0117】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*P. multocida* Cas9であ
 り得、アミノ酸配列：

【化18-1】

MQTTNLSYILGLDLGIASVGWAVVEINENEDPIGLIDVGVRIFERAEVPTKTESLALSRRLARSTRRLIRRA
 HRLLLAKRFLKREGILSTIDLEKGLPNQAWELRVAGLERRLSAIEWGAVLLHLIKHRGYLSKRKNESQTN
 KELGALLSGVAQNHQLLQSDDYRTPAELALKKFAKEEGHIRNQRGAYTHTFNRLDLLAELNLLFAQQHQF
 GNPHCKEHIQQYMTPELLMWQKPAISGEAILKMLGKCTHEKNEFKAAKHTYSAERFVWLTKLNNLRILE
 GAERALNEEERQLLINHPYEKSKLTYAQVRKLLGLSEQAIFKHLRYSKENAESATFMELKAWHAIRKALEN

10

20

30

40

【化18-2】

QGLKDTWQDLAKKPDLLDEIGTAFSLYKTDEDIQQYLTKNVPNSVINALLVSLNFDKFIELSLKSLRKILPL
 MEQGKRYDQACREIYGHYGEANQKTSQLLPAIPAQEIRNPVVLRTLSQARKVINAIRQYGS PARVHIETG
 RELGKSFKERREIQKQEDNRTKRESAVQKFELFSDFSSEPKSKDILKFRLYEQQHGKCLYSGKEINIHL
 NEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLASENQKNGNQTPYEWLQGKINSERWKNFVALVLGSQCSAA
 KKQRLLTQVIDDNKFIDRNLDTRYIARFLSNYIQENLLL VGKNKKNVFTPNGQITALLRSRWGLIKARENN
 NRHHALDAIVVACATPSMQQKITRFIRFKEVHPYKIENRYEMVDQESGEIISPHFPEPWAYFRQEVNIRVFD
 NHPD TVLKEMLPDRPQANHQFVQPLFVSRAPTRKMSGQGHMETIKSAKRLAEGISVLRIPLTQLKPNLLEN
 MVNKEREPALYAGLKARLAEFNQDPAKAFATPFYKQGGQVKAIRVEQVQKSGVLVRENNGVADNASIV
 RTDVFIKNNKFFLVPIYTWQVAKGILPNKAIVAHKNEDEWEEMDEGAKFKFSLFPNDLVELKTKKEYFFGY
 YIGLDRATGNISLKEHDGEISKGKDG VYRVGVKLALSFEKYQVDELGKNRQICRPQQRQPVR (配列番号162)
 を含み得るまたはそれからなり得る。

10

【0118】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*Francisella novicida* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化19】

MNFKILPIAIDLGVKNTGVFSAFYQKGTSLERLDNKNKGVYELSKDSYLLMNNRTARRHQRRGIDRKQL
 VKRFLKLIWTEQLNLEWDKDTQQAISFLFNRRGFSFITDGYSPYLNIVPEQVKAILMDIFDDYNGEDDLDS
 YLKLATEQESKISEIYNKLMQKILEFKLMKLCCTDIKDDKVSTKTLKEITSYEFELLADYLANYSES LKTQKFS
 YTDKQGNLKELSYHHDKYNIQEF LKRHATINDRILD TLLTDDLDIWNFNFEKFD FDKNEEKLQNQEDKD
 HIQAHLHHFVFAVNKIKSEMASGGRHRSQYFQEITNVLDENNHQEGYLKNFCENLHNKKYSNLSVKNL VN
 LIGNLSNLELKLPLRKYFNDKIHAKADHWDEQKFTETYCHWILGEWRVGVKDDQDKKDGAKYSYKDL CNEL
 KQKVTKAGLVDFLELDPCRTIPPYLDNNNRKPCKQSLILNPKFLDNQYPNWQQYLQELKKLQSIQNYLD
 SFETDLKVLKSSKDQPYFVEYKSSNQQIASGQRDYKDL DARILQFIFDRVKASDELLENIYFQAKK LKQKA
 SSELEKLESSKKLDEVIANSQLSQILKSQHTNGIFEQGTFLHLVCKYYKQRQRARDSRLYIMPEYRYDKKLH
 KYNNTGRFDDDNQLLTYCNHKPRQRYQLLNDLAGVLQVSPNFLKDKIGSDDDLFISKWLVEHIRGFKKA
 CEDSLKIQKDNRGLLNHKINIARNTKGKCEKEIFNLICKIEGSEDKKGNYPKHGLAYELGVLLFGEPNEASKP
 EFDRKIKKFNISYSAQIQIAFAERKGNANTCAVCSADNAHRMQQIKITEPVEDNKDKIILSAKAQRLPAIP
 TRIVDGA VKKMATILAKNIVDDNWQNIKQVLSAKHQHLHIPITESNAFEFEPALADVKGKSLKDRRKKALE
 RISPENIFKDKNNRIKEFAKGISAYSGANLTDGDFDGAKEELDHIIPRSHKKYGTLNDEANLICVTRGDKN
 KGNRIFCLRDLADNYK LKQFETDDLEIEKKIADTIWDANKKDFKFGNYRSFINLTPQEQA FRHALFLADE
 NPIKQAVIRAINNRNRTFVNGTQRYFAEVLANNIYLRAKKENLNTDKISFDYFGIPTIGNGRGIAEIRQLYEK
 VSDSIQAYAKGDKPQASYSHLIDAMLAFCIAADEHRNDGSIGLEIDKNYSLYPLDKNTGEVFTKDIFSQIKIT
 DNEFSDKKLVRKKAIEGFNTHRQMT RDGIYAENYLPILHKELNEVRKGYTWKNSEEIKIFKGKKYDIQQL
 NNLVYCLKFVDKPI SIDIQISTLEELRNILTTNIAATAEYYYINLKTQKLHEYYIENYNTALGYKKYSKEME
 FLRSLAYRSERVKIKSIDDVKQVLDKDSNFHIGKITLPFKKEWQRLYREWQNTTIKDDYEF LKSFNFVKSITK
 LHKKVRKDFSLPISTNEGKFLV KRKTWDN NFIYQILNDSDSRADGTPFIPAFDISKNEIVEAIIDSFTSKNIF
 WLPKNIELQKVDNKNIFAIDTSK WFEVETPSDLRDIGIATI QYKIDNNSRPKVRVKLDYVIDDDSKINYFMN
 HSLKSRYPDKVLEILKQSTIEFESSGFNKTIKEMLGMKLAGIYNETSNN (配列番号163)
 を含み得るまたはそれからなり得る。

20

30

40

【0119】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*Lactobacillus buchneri* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化 2 1 - 2】

LEKAIKEFGSQILKEHPTDNQELRNNRLYL YYLQNGKDMYTGQDLDIHNLSNYDIDHIVPQSFITDNSIDNL
 VLTSSAGNREKGGDVPPLEIVRKRKVFWEKLYQGNLMSKRKFDYLTKAERGGTTEADKARFIHRQLVETR
 QITKNVANILHQRFNYEKDDHGNTMKQVRIVTLKSALVSQFRKQFQLYKVRDVNDYHHAHDAYLNGVV
 ANTLLKVYPQLEPEFVYGDYHQFDWFKANKATAKKQFYTNIMLFFAQKDRIIDENGEILWDKKYLDTVKK
 VMSYRQMNIVKKTEIQKGEFSKATIKPKGNSSKLIPRKTNDWPMKYGGLDSPNMAYAVVIEYAKGKNKLV
 FEKKIIRVTIMERKA FEKDEKAFLEEQGYRQPKVLAKLPKYTLYECEEGRRRMLASANEAQKGNQQVLPN
 HLVTLLHHAANCEVSDGKSLDYIESNREMFAELLAHVSEFAKRYTLAEANLNKINQLFEQNKEGDIAIAQ
 SFVDLMAFNAMGAPASFKFFETTIERKRYNNLKELLNSTHIIQSITGLYESRKRLDD (配列番号 165)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 2 1】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*L. pneumophila* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化 2 2】

MESSQILSPIGIDLGGKFTGVCLSHLEAFAELPNHANTKYSVILIDHNNFQLSQAQRRATRHRVRNKKRNQF
 VKRVALQLFQHILSRDLNAKEETALCHYLNNGYTYVDTLDEYIKDETTINLLKELLPSESEHNFIDWFLQ
 KMQSSEFRKILVSKVEEKDDKELKNAVKNKNFITGFENKNSVEGHRHRKVYFENIKSDITKDNQLDSIKKK
 IPSVCLSNLLGHLSNLQWKNLHRYLAKNPKQFDEQTFGNEFLRMLKNFRHLKGSQESLAVRNLIQQLEQSQ
 DYISILEKTPPEITIPPYEARTNTGMEKQDQSLLNPEKLNLYPNWRNLIPGIIDAHFPLEKDLEHTKLRDRKR
 IISPSKQDEKRD SYILQRYLDLNNKIDKFKIKKQLSFLGQKQLPANLIETQKEMETHFNSSLVSVLIQIASAY
 NKEREDAAQGIWFDNAFSLCELSNINPPRKQKILPLLVGAILSEDFINNKDKWAKFKIFWNTHKIGRTSLKS
 KCKEIEEARKNSGNAFKIDYEEALNHPEHSNNKALIKIIQTIPDIIQAIQSHLGHNDSQALIYHNPFSLSQLYTI
 LETKRDGFHKNCVAVTCENYWRSQKTEIDPEISYASRLPADSVRPFDFGLARMMQRLAYEIAMAKWEQIK
 HIPDNSSLLIPIYLEQNRFEFEESFKKIKGSSSDKTLEQAIEKQNIQWEEKFQRIINASMNICPYKGASIGGQGE
 IDHIYPRSLSKKHFGVIFNSEVNLIYCSSQGNREKKEEHYLLLEHLSPLYLKHQFGTDNVSDIKNFISQNVANI
 KKYISFHLLTPEQQAARHALFLDYDDEAFKTITKFLMSQQKARVNGTQKFLGKQIMEFLSTLADSKQLQL
 EFSIKQITAEVVDHRELLSKQEPKLVKSRQSFPSHAIDATLTMSIGLKEFPQFSQELDNSWFINHLMPEV
 HLNVPVRSKEKYNKPNISSTPLFKDSL YAERFIPVWVKGETFAIGFSEKDLFEIKPSNKEKLFLLKTYSTKNP
 GESLQELQAKSKAKWLYFPINKTLALEFLHHYFHKEIVTPDDTTVCHFINSRLYYTKESITVKILKEPMPVL
 SVKFESSKKNVLGSKHTIALPATKDWERLNFHPNFLALKANPAPNPKEFNEFIRKYFLSDNNPNSDIPNNG
 HNIKPKQKHA VRKVFSLPVPGNAGTMMRIRKDNKGQPLYQLQTIDDTPSMGIQINEDRLVKQEVLMDA
 YKTRNLSTIDGINNSEGQAYATFDNWLTPVSTFKPEIIKLEMKPHSKTRRYIRITQSLADFIKTIDEALMIKP
 SDSIDDPLNMPNEIVCKNKLFGNELKPRDGKMKIVSTGKIVTYEFESDSTPQWIQTL YVTQLKKQP
 (配列番号 166)

20

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 2 2】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*N. lactamica* Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化 2 3 - 1】

MAAFKPNPMNYILGLDIGIASVGWAMVEVDEEENPIRLIDLGVRFERAEVPGTGD SLAMARRLARSVRRL
 TRRRAHRLLRARRLLKREGVLQDADFENGLVKS LNPWPQLRAAALDRKLTCLWESA VLLHLVKHRGY
 LSQRKNEGETADKELGALLKGVADNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQA

50

【化23-2】

ELNLLFEKQKEFGNPHVSDGLKEDIETLLMAQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAAKNTYTAERFIWL
 TKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEM
 KAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSTELQDEIGTAFSLFKTDKTDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKQVQIS
 LKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYCKKNAEKKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQARKVINCVRRY
 GSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCL
 YSGKEINLVRNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKA
 RVETSFRPRSKKQRILLQKFDEEGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGF
 WGLRKRVTENDRHHALDAVVVACSTVAMQKQITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKAHFPQPWE
 FFAQEV MIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLR TLLAEKLSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVK
 SAKRLDEGISVLRVPLTQLKLGLEKMNREPERKLYDALKAQLETHKDDPAKAFAPFYKYDKAGSRTQ
 QVKA VRIEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGGKYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVAFKDEE
 DWTVMDDSFREFRVLVYANDLIKLTAKKNEFLGYFVSLNRATGAIDIRTHD TDSTKGKNGIFQSVGVTALS
 FQKNQIDELGKEIRPCRLKKRPPVR (配列番号 167)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0123】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、N.meningitides Cas9であり得、アミノ酸配列：

20

【化24】

MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEDENPICLIDLGVRFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLT
 RRRARHLLRARRLLKREGVLQAADFENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLS
 QRKNEGETADKELGALLKGVADNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAE
 ILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAAKNTYTAERFIWLTKL
 NNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAY
 HAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPQLQDEIGTAFSLFKTDDEITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKQVQISL
 KALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQARKVINGVRRY
 GSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCL
 YSGKEINLVRNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKAR
 VETSFRPRSKKQRILLQKFDEEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGKRRVFASNGQITNLLR
 GFWGLRKRVTENDRHHALDAVVVACSTVAMQKQITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWE
 FFAQEV MIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLR TLLAEKLSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETV
 KSAKRLDEGISVLRVPLTQLKLGLEKMNREPERKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQV
 KAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVAQKDEEDW
 QLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKARMFGYFASCHRG TGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALS
 SFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVR (配列番号 168)

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0124】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、B.longum Cas9であり得、アミノ酸配列：

【化25-1】

MLSRQLLGASHLARPVSYSYNVQDNDVHCSYGERCFMRGKRYRIGIDVGLNSVGLAAVEVSDENSPVRL
 NAQSVIHDGGVDPQKNKEAITRKNMSGVARTRRMRRRKRERLHKLDMLLGKFGYPVIEPESLDKPFEEW

50

【化 2 5 - 2】

HVRAELATRYIEDDELRRRESISIALRHMARHRGWRNPYRQVDSLISDNPYSKQYGELKEKAKAYNDDATA
 AEEESTPAQLVVAMLDAGYAEAPRLRWRTGSKKPAEGYLPVRLMQEDNANELKQIFRVQRPADDEWKP
 LFRSVFYAVSPKGSAEQRVGQDPLAPEQARALKASLAFQEYRIANVITNLRKIDASAELRKLTVDEKQSIYD
 QLVSPSSEITWSDLCDFLGFKRSQKGVGSLTEDGEERISSRPPRLTSVQRIYESDNKIRKPLVAWWKSAS
 DNEHEAMIRLLSNTVDIDKVREDVAYASAIEFIDGLDDDALTKLDSVDLPSGRAAYSVELTQKLTRQMLTT
 DDDLHEARKTLFNVTDSWRPPADPIGEPLGNPSVDRVLKNVNRYL MNCQQRWGNPVSVNIEHVRSSFSSV
 AFARKDKREYEKNNKRSIFRSSLSEQLRADEQMEK VRESDLRRLLEAIQRQNGQCLYCGRTITFRTCEMDH
 IVPRKGVGSTNTRTNFAAVCAECNRMKSNTPFAIWARSEDAQTRGVSLAEAKKRVTMFTFNPKSYAPREV
 KAFKQAVIARLQQTEDDAAIDNRSIESVAWMADDELHRRIDWYFNAKQYVNSASIDDAEAETMKTTVSVFQ
 GRVTASARRAAGIEGKIHFQSQSKTRLDRRHHAVDASVIAMMNTAAAQTLMERESLRESQRLIGLMPGER
 SWKEYPYEGTSRYESFHLWLDNMDVLELLNDALDNDRIAVMQSQRYVLGNSIAHDATIHPLEK VPLGSA
 MSADLIRRASTPALWCALTRLPDYDEKEGLPEDSHREIRVHDTRY SADDEMGFFASQAAQIAVQEGSADIG
 SAIHHARVYRCWKTNAKGVRKYFYGMIRVFQTDLLRACHDDLFTVPLPPQSISMRYGEP RVVQALQSGNA
 QYLGSLVVGDEIEMDFSSLDVDGQIGEYLQFFSQFSGGNLAWKHWVVDGFFNQTLRIRPRYLA AEGLAK
 AFSDDVVPDGVQKIVTKQGWLPPVNTASKTAVRIVRRNAFGEPRLSSAHMPCSWQWRHE (配列番号 169)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【 0 1 2 5】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*A. muciniphila* Cas9
 であり得、アミノ酸配列：

【化 2 6】

MSRSLTFSFDIGYASIGWAVIASASHDDADPSVCGCGTVLFPKDDCQAFKRREYRRLRRNIRSRRVRIERIG
 RLLVQAQIITPEMKETSGHPAPFYLAASEALKGHRTLAPIELWHVLRWYAHNRGYDNNASWSNSLSEDGGN
 GEDTERVKHAQQLMDKHGTATMAETICRELKLEEGKADAPMEVSTPAYKNLNTAFPRLIVEKEVRRILELS
 APLIPGLTAEIIELIAQHHLTTEQRGVLLQHGKILARRYRGSLLFGQLIPRFDNRIISRCPVTWAQVYEAELK
 KGNSEQSARERAELKSKVPTANCPEFYEYRMARILCNIRADGEPLSAEIRRELMNQARQEGKLTKASLEKAI
 SSRLGKETETNVSNYFTLHPDSEEALYLNPAVEVLQRSGIGQILSPSVYRIANRLRRGKSVTPNYLLNLLKS
 RGESGEALEKKIEKESKKKEADYADTPLPKPYATGRAPYARTVLKKVVEEILDGEDPTRPARGEAHPDGEL
 KAHDGCLYCLLDTDSSVNQHOKERRLDTMTNHLVRHRMLILDRLLKDLIQDFADGQKDRISRVCVEVG
 KELTTFSAMDSKKIQRELTLRQKSHTDAVNRLKRKLPKALSANLIRKCRIAMDMNWTCPFTGATYGDHE
 LENLELEHIVPHSFRQSNALSSLVLTWPGVNRMKGQRTGYDFVEQEENPVPDKPNLHICSLNNYRELVEK
 LDDKKGHEDDRRRKKRKRKALLMVRGLSHKHQSQNHEAMKEIGMTEGMMTQSSHLMKLACKSIKTSLPD
 AHIDMIPGAVTAEVRKAWDVFGVFKELCPEAADPDSGKILKENLRSLTHLHHALDACVGLIPYIIPAHHN
 GLLRRVLAMRRIPEKLIPQVRPVANQRHYVLNDDGRMMLRDL SASLKENIREQLMEQRVIQHVPADMGG
 ALLKETMQRVLSVDGSGEDAMVSLSKKDGKKEKNQVKASKLVGVFPEGPSKLLKALKAAIEIDGNYGVA
 LDPKPVVIRHIKVFKRIMALKEQNGGKPVRLKKGMLIHLTSSKDPKHAGVWRIESIQDSKGGVKLDLQRA
 HCAVPKNKTHECNWREVDLISLLKQMKRYPTSYTGTPR (配列番号 170)

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 2 6】

一部の実施形態では、Cas9タンパク質は、*O. laneus* Cas9
 であり得、アミノ酸配列：

【 0 1 2 7】

【化 2 7】

METTLGIDLGTNSIGLALVDQEEHQILYSGVRFPEGINKDTIGLGEKEESRNATRAKRQMRQYFRKKLR
 KAKLLELLIAYDMCPLKPEDVRRWKNWQKQKSTVVRQFPDTPAFREWLKQNPYELRKQAVTEDVTRPEL
 GRILYQMIQRRGFLSSRKKGKEEGKIFTGKDRMVGIDETRKNLQKQTLGAYLYDIAPKNGEKYRFRTERVRA
 RYTLRDMYIREFEIHWQRQAGHLGLAHEQATRKKNIFLEGSATNVRNSKLITHLQAKYGRGHVLIEDTRITV
 TFQLPLKEVLGGKIEIEEQKFKSNESVLFWQRPLRSQKSLLSKCVFEGRNFYDPVHOKWIIAGPTAPLSH
 PEFEEFRAYQFINNIYGKNEHLTAIQREAVFELMCTESKDFNFEEKIPKHLKLFKFNFD DTKVPACTTISQL
 RKLFPHPVWEEKREEIWHCFYFYDDNTLLFEKLQKDYALQTNDEKIKKIRLSESYGNVSLKAIRRNINPYLK
 KGYAYSTAVLLGGIRNSFGKRFEYFKEYEPEIEKAVCRILKEKNAEAGEVIRKIKDYLVHNRFGFAKNDRAFQ
 KLYHHSQAITTQAQKERLPETGNLRNPIVQQGLNELRRTVNKLLATCREKYGPSFKFDHIHVEMGRELRSS
 KTEREKQSRQIRENEKKNEAAKVLAEYGLKAYRDNQKYLKYKEIEEKGTVCCPYTGKTLNISHTLGS
 NSVQIEHIIPYISLDDSLANKTLCDATFNREK GELTPYDFYQKDP SPEK WGASSWEEIEDRAFRLLPYAKAQ
 RFIRKPKQESNEFISRQLNDTRYISKKA VEYLSAICSDVKAFPGQLTAELRHLWGLNNILQSAPDITFPLVSA
 TENHREYYVITNEQNEVIRLFPKQGETPRTEK GELLLTGEVERKVFRCKGMQEFQTDVSDGKYWRRIKLSS
 SVTWSPLFAPKPIADGQIVLKGRIEKG VFCNQLKQKLTGLPDGSYWISLPVISQTFKEGESVNNSKLT SQ
 QVQLFGRVREGIFRCHNYQCPASGADGNFWCTLD TDTAQAFTPIKNAPPGVGGGQIILTG DVDDK GIFHA
 DDDLHYELPASLPKGKYYGIFTVESCDPTLPIELSAPKTSKGENLIEGNIWVDEHTGEVRFDPKKNREDQR
 HHAIDAIVIALSSQSLFQRLSTYNARRENKKRGLDSTEHPSPWP GFAQDVRQSVVPLLVS YKQNP KTLCKI
 SKTLYKDGKKIHSCGNAV RGQLHKETVYGQRTAPGATEKSYHIRKDIRELKT SKHIGKVVDITIRQMLLKH
 LQENYHIDITQEFNIPSNAFFKEGVYRIFLPNKHGEPVPIKKIRMKEELGNAERLKD NINQYVNPRNNHHVMI
 YQDADGNLKEEIVSFWSVIERQNQGQPIYQLPREGRNIVSILQINDTFLIGLKEEPEVYRNDLSTLSKHL YR
 VQKLSGMYTYFRHHLASTLNNEREEFRIQSLEAWKRANPVK VQIDEIGRITFLNGPLC (配列番号 171)

10

20

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0128】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、CRISPR Casタンパク質またはその一部から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、CRISPR Casタンパク質は、V型CRISPR Casタンパク質を含む。一部の実施形態では、V型CRISPR Casタンパク質は、Cpf1タンパク質を含む。本開示の例示的なCpf1タンパク質は、これだけに限定されないが、細菌または古細菌を含めた、任意の種から単離し得るまたはそれに由来し得る。本開示の例示的なCpf1タンパク質は、これだけに限定されないが、*Francisella tularensis* subsp. *novicida*、*Acidaminococcus* sp. BV3L6および*Lachnospiraceae bacterium* sp. ND2006を含めた、任意の種から単離し得るまたはそれに由来し得る。本開示の例示的なCpf1タンパク質はヌクレアーゼが不活化されたものであり得る。

【0129】

本開示の例示的な野生型*Francisella tularensis* subsp. *Novicida* Cpf1 (FnCpf1)タンパク質は、アミノ酸配列：

【化 2 8】

1 MSIQEFV NK YSLSKTLRFE LIPQGKTLEN IKARGLI LDD EKRAKDYKKA KQIIDKYHQF
 61 FIEEILSSVC ISEDLLQNY S DVYFKLKKSD DDNLQKDFKS AKDTIKKQIS EYIKDSEKFK
 121 NLFNQLIDA KKGQESDLIL WLKQSKDNGI ELFKANS DIT DIDEALEI IK SFKGWTTYFK
 181 GFHENRKNVY SSNDIPT SII YRIVDDNLPK FLENKAKYES LKDKAPEAIN YEQIKKDLAE
 241 ELTFDIDYKT SEVNQRV FSL DEVFEIANFN NYLNQSGITK FNTIIGGKFV NGENTKRKGI
 301 NEYINLYSQQ INDKTLKKYK MSVLFKQILS DTESKSFVID KLEDDSDVVT TMQSFYEQIA
 361 AFKTVEEKSI KETLSLLFDD LKAQKLDLSK IYFKNDKSLT DLSQQVFDDY SVIGTAVLEY
 421 ITQQIAPKNL DNPSKKEQEL IAKKTEKAKY LSLETIKLAL EEFNKHRDID KQCRFEEILA
 481 NFAAIPMIFD EIAQNKDNLA QISIKYQNGG KKDLLQASAE DDVKAIKDLL DQTNLLHKL
 541 KIFHISQSED KANILDKDEH FYLVFEECYF ELANIVPLYN KIRNYITQKP YSDEKFKLNF
 601 ENSTLANGWD KNKEPDNTAI LFIKDDKY YL GVMNKKNKI FDDKAIKENK GEGYKKIVYK
 661 LLPGANKMLP KVFFSAKSIK FYNPSEDILR IRNHSTHTKN GSPQKGYEKF EFNIEDCRKF
 721 IDFYKQSISK HPEWKDFGFR FSDTQRYNSI DEFYREVENQ GYKLT FENIS ESYIDSVVNQ
 781 GKLYLFOIYN KDFSAYSKGR PNLHTLYWKA LFDERNLQDV VYKLNGEAEL FYRKQSIPKK
 841 ITHPAKEAIA NKNKDNPKKE SVFEYDLIKD KRFTEDKFFF HCPITINFKS SGANKFNDEI
 901 NLLLKEKAND VHILSIDRGE RHLAYYTLVD GKGNIKQDT FNIIGNDRMK TNYHDKLAAI
 961 EKDRDSARKD WKKINNIKEM KEGYLSQV VH EIAKLVI EYN AIVVFEDLNF GFKRGRFQVE
 1021 KQVYQKLEKM LIEKLNLYLVF KDNEFDKTTGG VLRAYQLTAP FETFKKMGKQ TGIYYVPAG
 1081 FTSKICPVTG FVNQLYPKYE SVSKYQEFFS KFDKICYNLD KGYFEFSFDY KNFGDKAAG
 1141 KWTIASFGSR LINFNRSDKN HNWDTREVYP KTELEKLLKD YSIEYGHGEC IKAACGESD
 1201 KKFFAKLTSV LNTILQMRNS KTGTELDYL I SPVADVNGNF FDSRQAPKNM PQDADANGAY
 1261 HIGLKGLMLL GRIKNNQEGK KLNLVIKNEE YFEFVQNRNN (配列番号 172)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0 1 3 0】

本開示の例示的な野生型 *Lachnospiraceae bacterium* sp. ND2006 Cpf1 (LbCpf1) タンパク質は、アミノ酸配列：

【化 2 9】

1 AASKLEKFTN CYSLSKTLRF KAIPVGKTQE NIDNKRLIVE DEKRAEDYKG VKKLLDRYYL
 61 SFINDVLHSI KLKNLNNYIS LFRKKTRTEK ENKELENLEI NLRKEIAKAF KGAAGYKSLF
 121 KKDIIEITILP EAADDKDEIA LVNSFNGFTT AFTGFFDNRE NMFSEEAKST SIAFR CINEN
 181 LTRYISNMDI FEKVDAIFDK HEVQEIKEKI LNSDYDVEDF FEGEFFNFVL TQEGIDVYNA
 241 IIGGFVTESE EKIKGLNEYI NLYNAKTQA LPKFKPLYKQ VLS DRESLSF YGEGYTSDEE
 301 VLEVFRNTLN KNSEIFSSIK KLEKLFKNFD EYSSAGIFVK NGPAISTISK DIFGEWNLIR
 361 DKWNAEYDDI HLKKA VVTE KYEDDRRKS F KKIGSFSLEQ LQYADADLS VVEKLKEIII
 421 QKVDEIYKVY GSSEKLF DAD FVLEKSLKKN DAVVAIMKDL LDSVKS FENY IKAFFGEGKE
 481 TNRDESFYGD FVLAYDILLK VDHIYDAIRN YVTQKPYSK D KFKLYFQNPQ FMGGWDKDK E
 541 TDYRATILRY GSKYYLAIMD KKYAKCLQKI DKDDVNGN YE KINYKLLPGP NKMLPKVFFS
 601 KKWMAYNPS EDIQKIYKNG TFKKGD MFNL NDCHKLIDFF KDSISRYPKW SNAYDFNFSE
 661 TEKYKDIAGF YREVEEQGYK VSFESASKKE VDKLVEEGKL YMFQIYNKDF SDKSHGTPNL
 721 HTMYFKLLFD ENNHGQIRLS GGAE LFM RRA SLKKEELV VH PANSP IANKN PDNPKTTTL
 781 SYDVYKDKRF SEDQYELHIP IAINKCPKNI FKINTEVRVL LKHDDNPYVI GIDRGERNLL
 841 YIVVVDGKGN IVEQYSLNEI INN FN G IRIK TDYHSLLDKK EKERFEARQN WTSIENIKEL
 901 KAGYISQV VH KICELVEKYD AVIALEDLNS GFKN SRVKVE KQVYQKFEKM LIDKLN YMVD
 961 KKS NPCATGG ALKGYQITNK FESFKSMSTQ NGFI FYI PAW L TSKIDPSTG FVNLLKTKYT
 1021 SIADSKKFIS SFDRIMYVPE EDLFEFALDY KNFSRTDADY IKKWKLYSYG NRIRIFA AAK
 1081 KNNVFAWEEV CLTSAYKELF NKYGINYQQG DIRALLCEQS DKAFYSS FMA LMSLMLQMRN
 1141 SITGR TDVDF LISPVKNSDG IFYDSR NYEA QENAILPKNA DANGAYNIAR KVLWAI GQFK
 1201 KAEDKLDKV KIAISNKEWL EYAQTSVK (配列番号 173)

30

40

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0 1 3 1】

本開示の例示的な野生型 *Acidaminococcus* sp. BV3L6 Cpf1 (AsCpf1) タンパク質は、アミノ酸配列：

【化30】

1 MTQFEGFTNL YQVSKTLRFE LIPQGKTLKH IQEQGFIEED KARNDHYKEL KPIIDRIYKT
 61 YADQCLQLVQ LDWENLSAAI DSyrKEKTEE TRNALIEEQa TYRNAIHdYF IGRTDNLtDA
 121 INKRHAeiYK GLFKAELFNG KVLKQLGTVT TTEHENALLR SFDKFTTYFS GFYENRKNVF
 181 SAEDISTAIP HRIVQDNFPK FKENCHIFTR LITAVPSLRE HFENVKKAIG IFVSTSiEEV
 241 FSFPFYnQLL TQTQIDLYnQ LLGGISREAG TEKIKGLNEV LNLAIQKND E TAHIIASLPH
 301 RFIPLFKQIL SDRNTLSFIL EEFKSDEEVI QSFCKYKtLL RnENVLETAE ALFNELNSID
 361 LTHIFISHKK LETISSALCD HWDTLRNALY ERRISELTGK ITKSAKEKVQ RSLKHEDINL
 421 QEIIISAAGKE LSEAFKQKTS EILSHAHAAAL DQPLPTTLKQ QEEKEILKSQ LDsLLGLYHL
 481 LDWFAVDES N EVDPEFSARL TGIKLEMEPS LSFYNKARNY ATKkPYsVEK FKLNFQMPtL
 541 ASGWDVNKEK NNGAILFVK N GLYLLGIMPK QKGRYKALS F EPTEKTSEGF DKMYDYfPD
 601 AAKMIPKcST QLKAvtAHfQ THtTPILLsN NFIEPLEITK EIYDLNNPEK EPKkFQTAYa
 661 KKTGDQKGYR EALCKWIDFT RDFLSKYTKT TSIDLSSLRP SSQYKDLGEY YAElnPLLYH
 721 ISFQRIAEKE IMDAVETGKL YLFQIYNKDF AKGHHGKPNL HTLYWTGLFS PENLAKTSIK
 781 LNgQAElfYR PKSRMKRMAH RLGEKMLNKK LKDQKTPIPD TLYQELYDYV NHRLSHDLSd
 841 EARALLPNVI TKEVSHEIIK DRRFTSDKFF FHVpITLNYQ AANSPSKFNQ RVNAYLKEHP
 901 ETPIIGIDRG ERNLIYITVI DSTGKILEQR SLNTIQQFDY QKKLDNREKE RvAARQAWsV
 961 VGTIKDLKQG YLSQVIHEIV DLMIHYQAVV VLENLNFGEK SKRTGIAEKa VYQqFEKMLI
 1021 DKLNCLVLKD YPAEKVGGVL NPYQLTDQFT SFAKMGtQSG FLfYVPAPYt SKIDPLtGFV
 1081 DPFVWKTiKN HESRKHfLEG FDFLHYDVKT GDFILHFkMN RNLSfQRGLP GFMPAWDIVE
 1141 EKNETQfDAK GTPFIAGKRI VPVIENHRFT GRyRDLYPAN ELIALLEEKG IVFRDGSNIl
 1201 PKLLENDdSH AIDTMVALIR SVLQMRNSNA ATGEDYINSP VRDLNGVCfD SRFQNPewPM
 1261 DADANGAYHI ALKQQLLNH LKESKDLKlQ NGISNQDWLA YIQELRN (配列番号 174)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0132】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、CRISPR Cas タンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、CRISPR Cas タンパク質は、VI型CRISPR Cas タンパク質またはその一部を含む。一部の実施形態では、VI型CRISPR Cas タンパク質は、Cas13 タンパク質またはその一部を含む。本開示の例示的なCas13 タンパク質は、これだけに限定されないが、細菌または古細菌を含めた、任意の種から単離し得るまたはそれに由来し得る。本開示の例示的なCas13 タンパク質は、これだけに限定されないが、*Leptotrichia wadei*、*Listeria seeligeri* serovar 1/2b (strain ATCC 35967 / DSM 20751 / CIP 100100 / SLCC 3954)、*Lachnospiraceae bacterium*、*Clostridium aminophilum* DSM 10710、*Carnobacterium gallinarum* DSM 4847、*Paludibacter propionicipigenes* WB4、*Listeria weihenstephanensis* FSL R9-0317、*Listeria weihenstephanensis* FSL R9-0317、*bacterium* FSL M6-0635 (*Listeria newyorkensis*)、*Leptotrichia wadei* F0279、*Rhodobacter capsulatus* SB 1003、*Rhodobacter capsulatus* R121、*Rhodobacter capsulatus* DE442および*Corynebacterium ulcerans*を含めた、任意の種から単離し得るまたはそれに由来し得る。本開示の例示的なCas13 タンパク質は、DNAヌクレアーゼが不活化されたものであり得る。本開示の例示的なCas13 タンパク質としては、これだけに限定されないが、Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13dおよびそれらのオルソログが挙げられる。本開示の例示的なCas13b タンパク質としては、これだけに限定されないが、本明細書ではそれぞれCsx27およびCsx28と称される亜型1および2が挙げられる。

30

40

【0133】

例示的なCas13a タンパク質としては、これだけに限定されないが、以下が挙げられる：

50

【表 3 - 1】

Cas13a の番号	Cas13a の略語	生物体名	受託番号	ダイレクトリポート配列
Cas13a1	LshCas13a	Leptotrichia shahii	WP_018451595.1	CCACCCCAATATCGAAGGGGACTAA AAC (配列番号 175)
Cas13a2	LwaCas13a	Leptotrichia wadei	WP_021746774.1	GATTTAGACTACCCCAAAAACGAAG GGGACTAAAAC (配列番号 176)
Cas13a3	LscCas13a	Listeria seeligeri	WP_012985477.1	GTAAGAGACTACCTCTATATGAAAG AGGACTAAAAC (配列番号 177)
Cas13a4	LbmCas13 a	Lachnospiraceae bacterium MA2020	WP_044921188.1	GTATTGAGAAAAGCCAGATATAGTT GGCAATAGAC (配列番号 178)
Cas13a5	LbnCas13a	Lachnospiraceae bacterium NK4A179	WP_022785443.1	GTTGATGAGAAGAGCCCAAGATAG AGGGCAATAAC (配列番号 179)
Cas13a6	CamCas13 a	[Clostridium] aminophilum DSM 10710	WP_031473346.1	GTCTATTGCCCTCTATATCGGGCTGT TCTCCAAAC (配列番号 180)
Cas13a7	CgaCas13a	Carnobacterium gallinarum DSM 4847	WP_034560163.1	ATTAAAGACTACCTCTAAATGTAAG AGGACTATAAC (配列番号 181)
Cas13a8	Cga2Cas13 a	Carnobacterium gallinarum DSM 4847	WP_034563842.1	AATATAAACTACCTCTAAATGTAAG AGGACTATAAC (配列番号 182)
Cas13a9	Pprcas13a	Paludibacter propionicigenes WB4	WP_013443710.1	CTTGTGGATTATCCCAAAATTGAAG GGAECTACAAC (配列番号 183)
Cas13a10	LweCas13a	Listeria weihenstephanen sis FSL R9-0317	WP_036059185.1	GATTTAGAGTACCTCAAAATAGAAG AGGTCTAAAAC (配列番号 184)
Cas13a11	LbfCas13a	Listeriaceae bacterium FSL M6-0635 (Listeria newyorkensis)	WP_036091002.1	GATTTAGAGTACCTCAAAACAAAAG AGGACTAAAAC (配列番号 185)

10

20

30

【表 3 - 2】

Cas13a12	Lwa2cas13a	Leptotrichia wadei F0279	WP_021746774.1	GATATAGATAACCCCAAAAACGAA GGGATCTAAAAC (配列番号 186)
Cas13a13	RcsCas13a	Rhodobacter capsulatus SB 1003	WP_013067728.1	GCCTCACATCACCGCCAAGACGACG GCGGACTGAAC (配列番号 187)
Cas13a14	RcrCas13a	Rhodobacter capsulatus R121	WP_023911507.1	GCCTCACATCACCGCCAAGACGACG GCGGACTGAAC (配列番号 188)
Cas13a15	RcdCas13a	Rhodobacter capsulatus DE442	WP_023911507.1	GCCTCACATCACCGCCAAGACGACG GCGGACTGAAC (配列番号 189)

10

【 0 1 3 4 】

本開示の例示的な野生型 Cas 13 a タンパク質は、アミノ酸配列：

【化 3 1】

1 MGNLFGHKRW YEVRDKKDFK IKRKVKVKRN YDGNKYILNI NENNNKEKID NNFIRKYIN
61 YKKNNDILKE FTRKFHAGNI LFKLKGKEGI IRIENDDDFL ETEEVVLYIE AYKSEKLKA
121 LGITKKKIID EAIRQGITKD DKKIEIKRQE NEEIEIDIR DEYTNKTLND CSIILRIEN
181 DELETKKSIIY EIFKNINMSL YKIEKIIEN ETEKVFENRY YEEHLREKLL KDDKIDVILT
241 NFMEIREKIK SNLEILGFVK FYLNVGGDKK KSKNKKMLVE KILNINVDLT VEDIADFFVIK
301 ELEFWNITKR IEKVKKVNE FLEKRRNRTY IKSIVLLDKH EKFKIERENK KDKIVKFFVE
361 NIKNNSIIEK IEKILAEFKI DELIKKLEKE LKKGNCDTEI FGIFKKHYKV NEDSKKFSK
421 SDEEKELYKI IYRYLKGRIE KILVNEQKVR LKKMEKIEIE KILNESILSE KILKRVKQYT
481 LEHIMYLGKL RHNDIDMTTV NTDDFSRLHA KEELDLELIT FFASTNMELN KIFSRENINN
541 DENIDFFGGD REKNYVLDKK ILNSKIKIIR DLDFIDNKNN ITNNFIRKFT KIGTNERNRI
601 LHAISKERDL QGTQDDYKNV INIIQNLKIS DEEVSKALNL DVVFKDKKNI ITKINDIKIS
661 EENNDIKYL PSFSKVLPEI LNLRYNNPKN EPFDTIETEK IVLNALIYVN KELYKLLILE
721 DDLEENESKN IFLQELKKTG GNIDEIDENI IENYKNAQI SASKGNKAI KKYQKKVIEC
781 YIGYLRKNYE ELDFDSDFKM NIQEIKKQIK DINDNKTYER ITVKTSDKTI VINDDFEYII
841 SIFALLNSNA VINKIRNRFV ATSVWLNTSE YQNIIDILDE IMQLNTRLNE CITENWNLNL
901 EEFIQKMKEI EKDFDDFKIQ TKKEIFNNYY EDIKNNILTE FKDDINGCDV LEKKLEKIVI
961 FDDETKFEID KKSNIHQDEQ RKLSNINKKD LKKKVDQYIK DKDQEIKSKI LCRIIFNSDF
1021 LKKYKKEIDN LIEDMESENE NKFQEIYYPK ERKNELYIYK KNLFLNIGNP NFDKIYGLIS
1081 NDIKMDAKF LFNIDGKNIR KNKISEIDAI LKNLNDKLNQ YSKEYKEKYI KKLKENDDF
1141 AKNIQNKNYK SFEKDYNRVS EYKKIRDIVE FNYLNKIESY LIDINWKLAI QMARFERDMH
1201 YIVNGLRELG IIKLSGYNTG ISRAYPKRNG SDGFYTTTAY YKFFDEESYK KFEKICYGFG
1261 IDLSENSEIN KPENESIRNY ISHFYIVRNP FADYSIAEQI DRVSNLLSYS TRYNNSTYAS
1321 VFEVFKKDVN LDYDELKCKF KLIGNNDILE RLMKPKKVSV LELESYNSDY IKNLIELELT
1381 KIENTNDTL (配列番号 190)

20

30

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 3 5 】

例示的な Cas 13 b タンパク質としては、これだけに限定されないが、以下が挙げられる：

【表 4 - 1】

種	Cas13b の受託番号	Cas13b のサイズ (aa)
Paludibacter propionicigenes WB4	WP_013446107.1	1155
Prevotella sp. P5-60	WP_044074780.1	1091
Prevotella sp. P4-76	WP_044072147.1	1091
Prevotella sp. P5-125	WP_044065294.1	1091
Prevotella sp. P5-119	WP_042518169.1	1091
Capnocytophaga canimorsus Ce5	WP_013997271.1	1200
Phaeodactylibacter xiamenensis	WP_044218239.1	1132

40

【表 4 - 2】

<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	WP_005873511.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> F0570	WP_021665475.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	WP_012458151.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> F0185	ERJ81987.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> F0185	WP_021677657.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD2	WP_023846767.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> F0568	ERJ65637.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W4087	ERJ87335.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W4087	WP_021680012.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i> F0568	WP_021663197.1	1136
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	WP_061156637.1	1136
<i>Porphyromonas gulae</i>	WP_039445055.1	1136
<i>Bacteroides pyogenes</i> F0041	ERI81700.1	1116
<i>Bacteroides pyogenes</i> JCM 10003	WP_034542281.1	1116
<i>Alistipes</i> sp. ZOR0009	WP_047447901.1	954
<i>Flavobacterium branchiophilum</i> FL-15	WP_014084666.1	1151
<i>Prevotella</i> sp. MA2016	WP_036929175.1	1323
<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 10230	EHO06562.1	1160
<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 3837	EKB06014.1	1158
<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 3837	WP_006265509.1	1158
<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 12901	WP_006261414.1	1158
<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 12901	EHO08761.1	1158
<i>Myroides odoratimimus</i> (NZ_CP013690.1)	WP_058700060.1	1160
<i>Bergeyella zoohelcum</i> ATCC 43767	EKB54193.1	1225
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	WP_041989581.1	1219
<i>Bergeyella zoohelcum</i> ATCC 43767	WP_002664492.1	1225
<i>Flavobacterium</i> sp. 316	WP_045968377.1	1156
<i>Psychroflexus torquis</i> ATCC 700755	WP_015024765.1	1146
<i>Flavobacterium columnare</i> ATCC 49512	WP_014165541.1	1180
<i>Flavobacterium columnare</i>	WP_060381855.1	1214
<i>Flavobacterium columnare</i>	WP_063744070.1	1214
<i>Flavobacterium columnare</i>	WP_065213424.1	1215
<i>Chryseobacterium</i> sp. YR477	WP_047431796.1	1146
<i>Riemerella anatipestifer</i> ATCC 11845 = DSM 15868	WP_004919755.1	1096
<i>Riemerella anatipestifer</i> RA-CH-2	WP_015345620.1	949
<i>Riemerella anatipestifer</i>	WP_049354263.1	949
<i>Riemerella anatipestifer</i>	WP_061710138.1	951
<i>Riemerella anatipestifer</i>	WP_064970887.1	1096
<i>Prevotella saccharolytica</i> F0055	EKY00089.1	1151
<i>Prevotella saccharolytica</i> JCM 17484	WP_051522484.1	1152
<i>Prevotella buccae</i> ATCC 33574	EFU31981.1	1128
<i>Prevotella buccae</i> ATCC 33574	WP_004343973.1	1128
<i>Prevotella buccae</i> D17	WP_004343581.1	1128
<i>Prevotella</i> sp. MSX73	WP_007412163.1	1128
<i>Prevotella pallens</i> ATCC 700821	EGQ18444.1	1126
<i>Prevotella pallens</i> ATCC 700821	WP_006044833.1	1126

10

20

30

40

【表 4 - 3】

Prevotella intermedia ATCC 25611 = DSM 20706	WP 036860899.1	1127
Prevotella intermedia	WP 061868553.1	1121
Prevotella intermedia 17	AFJ07523.1	1135
Prevotella intermedia	WP 050955369.1	1133
Prevotella intermedia	BAU18623.1	1134
Prevotella intermedia ZT	KJJ86756.1	1126
Prevotella aurantiaca JCM 15754	WP 025000926.1	1125
Prevotella pleuritidis F0068	WP 021584635.1	1140
Prevotella pleuritidis JCM 14110	WP 036931485.1	1117
Prevotella falsenii DSM 22864 = JCM 15124	WP 036884929.1	1134
Porphyromonas gulae	WP 039418912.1	1176
Porphyromonas sp. COT-052 OH4946	WP 039428968.1	1176
Porphyromonas gulae	WP 039442171.1	1175
Porphyromonas gulae	WP 039431778.1	1176
Porphyromonas gulae	WP 046201018.1	1176
Porphyromonas gulae	WP 039434803.1	1176
Porphyromonas gulae	WP 039419792.1	1120
Porphyromonas gulae	WP 039426176.1	1120
Porphyromonas gulae	WP 039437199.1	1120
Porphyromonas gingivalis TDC60	WP 013816155.1	1120
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277	WP 012458414.1	1120
Porphyromonas gingivalis A7A1-28	WP 058019250.1	1176
Porphyromonas gingivalis JCVI SC001	EOA10535.1	1176
Porphyromonas gingivalis W50	WP 005874195.1	1176
Porphyromonas gingivalis	WP 052912312.1	1176
Porphyromonas gingivalis AJW4	WP 053444417.1	1120
Porphyromonas gingivalis	WP 039417390.1	1120
Porphyromonas gingivalis	WP 061156470.1	1120

10

20

30

40

50

【 0 1 3 6 】

本開示の例示的な野生型 *Bergeyella zoohelcum* ATCC 43767 Cas 13 b (B z Cas 13 b) タンパク質は、アミノ酸配列：

【化 3 2 - 1】

1 menktslgnn iyynpfkppd ksyfagyfna amentdsvfr elgkrlkgke ytsenffdai
61 fkenislvey eryvklldsy fpmarlldkk evpikerken fkknfkgiik avrdlrnfyt
121 hkehgeveit deifgvldem lkstvlvtvkk kvktdktke ilkksiekql dilcqkkley
181 lrdtarkiee krrnqrerge kelvafkys dkrddliaai yndafdvyid kkkdskess
241 kakyntksdp qqeegdlkip isknqvfl slfltkqeih afkskiagfk atvideatvs
301 eatvshgkns icfmatheif shlaykklkr kvrtaeinyg eaenaqlsv yaketlmmqm
361 ldelskvpdv vyqnlsedvq ktfieldwney lkenngdvgt meeeqvihpv irkryedkfn
421 yfairfldef aqfptlrfqv hlgnylhdsr pkenlisdr ikekitvfgl lselehkkal
481 fikntetned rehyweifpn pnydfpkeni svndkdfpia gsildrekqp vagkigikvk
541 llngqyvsev dkavkahqlk qrkaskpsiq niieevpin esnpkeaivf ggqptaylsm
601 ndihsilyef fdkwekkkek lekkgelkr keigkelekk ivgkiqaiq qiidkdtak
661 ilkpyqdgns taidkeklik dlkqeqnilq klkdeqtvre keyndfiayq dknreinkvr
721 drnhkqylkd nlkrkypeap arkevlyyre kgkvavwlan dikrfmptdf knewkgeqhs
781 llqkslayye qckeelknll pekvfqhlpf klgyfyqqky lyqfytcyld krleyisglv
841 qqaenfksen kvfkkvenec fkflkkqnyt hkeldarvqs ilgypifler gfmdekptii
901 kgkftkgnea lfadwfryyk eyqnfqtfyd tenyplvele kkqadrkrkt kiyqqkknv
961 ftllmakhif ksvfkqdsid qfsledlyqs reerlgnqer arqtgerntn yiwnktvdlk

【化 3 2 - 2】

1021 lcdgkitven vklknvgdfi kyeydqrva flkyeeniew qaflikeske eenypyvver
1081 eieqekvrr eellkevhl eeyilekvkd keilkkgdnq nfkyylngl lkqlknedve
1141 sykvfnlnte pedvniqlk qeatdleqka fvltyrnkf ahnqlpkkef wdycqekykg
1201 ektyaey faevfkkeke alik (配列番号 191)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0137】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、CasRX/Cas13dタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。CasRX/Cas13dは、VI-D型CRISPR-Cas系のエフェクターである。一部の実施形態では、CasRX/Cas13dタンパク質は、RNAを切る(cut)またはそれに結合することができる、RNAによりガイドされるRNAエンドヌクレアーゼ酵素である。一部の実施形態では、CasRX/Cas13dタンパク質は、1つまたは複数の高等真核生物および原核生物ヌクレオチド結合性(HEPN)ドメインを含み得る。一部の実施形態では、CasRX/Cas13dタンパク質は、野生型HEPNドメインまたは変異型HEPNドメインのいずれかを含み得る。一部の実施形態では、CasRX/Cas13dタンパク質は、RNAを切ることはできないが、ガイドRNAをプロセシングすることができる変異型HEPNドメインを含む。一部の実施形態では、CasRX/Cas13dタンパク質は、プロトスペーサーランキン配列を必要としない。CasRX/Cas13dタンパク質のさらなる例および配列について、限定することなく、具体的な参照がなされる、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO公開第WO2019/040664号およびUS2019/0062724も参照されたい。

10

【0138】

例示的なCasRX/Cas13dタンパク質は、配列：

20

CasRX/Cas13d Gut__metagenome__contig6049000251:

【化33】

LYLTSFGKGN AAVIEQKIEP ENGYRVTGMQ ITPSITVNKA TDESVRFRVK RKIAQKDEFI	60
ADNPMHEGRH RIEPSAGSDM LGLKTKLEKY YFGKEFDNL HIQIIYNILD IEKILAVYST	120
NITA	124

(配列番号 54)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0139】

30

例示的なCasRX/Cas13dタンパク質は、配列：

CasRX/Cas13d Gut__metagenome__contig546000275:

【化34】

MDSYRPKLYK LIDFCIFKHY HEYTEISEKN VDTLRAAVSE EQKESFYADE AKRLWGIFDK	60
QFLGFCKKIN VVWNGSHEKE ILGYIDKDAY RKKSDVSYFS KFLYAMSFFL DGKEINDLLT	120
TLINKFDNIA SFISTAKELD AEIDRILEKK LDPVTGKPLK GKNSFRNFIA NNVIENKRFI	180
YVIKFCNPKN VLKLVKNTKV TEFVLKRMPE SQIDRYSSC IDTEKNPSVD KKISDLAEMI	240
KKIAFDDFRN VRQKTRTREE SLEKERFKAV IGLYLTVVYL LIKNLNVNS RYVMAFHCLE	300
RDALYGINI GKNYIELTED LCRENENSRS AYLARNKRLR DCVKQIDNA KNMKSKEK	358

40

(配列番号 57)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0140】

例示的なCasRX/Cas13dタンパク質は、配列：

CasRX/Cas13d Gut__metagenome__contig4114000374:

【化35-1】

DTKINPQTWL YQLENTPLDL NEYRDTLDHF FDERFNEINE HFVTQATNL CIMKEVFPDE	60
DFKSIADLYY DFIVVKSYPN IGFSIKKLE KMLELPEAKR VTSTEMDSVR SKLYKLIDFC	120

50

【化35-2】

IFKHYHEKPE TVEMIVSMLR AYTSEDMKE

149

(配列番号 61)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0141】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig721000
619 :

【化36】

KEGSTMAKNE KKKSTAKALG LKSSFVVNND IYMTSFGKGN KAVLEKKITE NTIENKSDTT	60
YFDVINRDPK GFTLEGRRRIA DMTAFSNDPK YHVNVDGKF LEDQLGARSE LEKKVFGRTF	120
DDNVHIQLIH NILDIEKIMA QYVSDIVYLL HNTIKRDMND DIMGYISIRN SFDDFCHPER	180
IPDRKAKDNL QKQHDIFIDE ILKCGRLAYF GNAFFEDGSD NKEIAKLKRY KEIYHIIALM	240
GSLRQSYFHG ENSDKNFQGP TWAYTLESNL TGKYKEFKDT LDKTFDERYE MISKDFGSTN	300
MVNLQILEEL LKMLYGNVSP	320

10

(配列番号 67)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0142】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig200200
0411 :

【化37】

EQNKAKYQA IISLYLMVMY QIVKNMIYVN SRYVIAFHCL ERDSNQLLGR FNSRDASMYN	60
KLTQKFITDK YLNDGAQGCS KKVGNLYLSHN ITCCSDELK EYRNQVDHFA VVRMIGKYAA	120
DIGKFSTWFE LYHYVMQRRII FDKRNPLSET ERTYKQLIAK HHTYCKDLVK ALNTPFGYNL	180
ARYKNLSIGE LFDRNNYNAK TKET	204

20

(配列番号 69)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0143】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig135520
00311 :

【化38】

LIDFLIYDLY YNRKPARIEE IVDKLRESVN DEEKESIYSA ETKYVYEALG KVLVRSLLKY	60
LNGATIRDLK NRYDAKTANR IWDISEHSKS GHVNCFCCLI YMMTLMLDGK EINDLLTTLV	120
NKFDNIASFI DVMDELGLEH SFTDNYKMFA DSKAICLDLQ FINSFARMSK IDDEKSKRQL	180
FRDALVVLDI GDKNEDWIEK YLTSDFIKRD ENGNKIDGK RDFRNFIA NN VIKSARFKYL	240
VKYSSADGMI KLKKNELIS FVLEQLPETQ IDRYYESCG L DCAVADRKVR IEKLTGLIRD	300
MREDNFRGVN YSNDACKKDK QAKAKYQAI SLYLMVLYQI VKNMIYVNSR YVIAFHCLER	360
DLLEFNIELD NSYQYSNCNE LTEKFIKDKY MKEGALGFNM KAGRYLTKNI GNCSNELRKI	420
YRNQVDHFAV VRKIGNYAAD IASVGSWFE	449

40

(配列番号 71)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0144】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig100370

50

0 0 5 2 7 :

【化 3 9】

YMDQNFANS AWAIHVYRNK IQHLDAVRHA DMYIGDIREF HSWFELYHYI IQRRIIDQYA 60
 YESTPGSSRD GSAIIDDEERL NPATRRYFRL ITTYKT 96

(配列番号 72)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0 1 4 5】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列 :

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig238000 10
 329 :

【化 4 0 - 1】

RYDKDRSKIY TMMDFVIYRY YIDNNNSID FINKLRSSID EKSKEKLYNE EANRLWNK 60

【化 4 0 - 2】

EYMLYIKEFN GKLASRTPDR DGNISEFVES LPKIHRLPR GQKISNFSKL MYLLTMFLDG 120
 KEINDLLTTL INKFENIQGF LDIMPEINVN AKFEPEYVFF NKSHEIAGEL KLIKGEAQM 180
 EPAATLKLEM TADAIKILGT EKEDAELIKL AESLFKDENG KLLGNKQHGM RNFIGNNVIK 240
 SKRFHYLIRY GDPAHLHKIA TNKNVVRVFL GRIADMQKKQ GQKGKNQIDR YYEVCVGNKD 300
 IKKTIEEKID ALTDIIVNMN YDQFEKKKAV IENQNRGKTF EEKNKYKRDN AEREKFKKII 360
 SLYLTVIYHI LKNIVNVNSR YILGFHCLER DKQLYIEKYN KDKLDGFVAL TKFCLGDEER 420
 YEDLKAKAQA SIQALETANP KLYAKYMNYS DEEKKEEFKK QLNRRERVKNA RNAYLKNIKN 480
 YIMIRLQLRD QTDSSGYLCG EFRDKVAHLE VARHAHEYI 519

20

(配列番号 73)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0 1 4 6】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列 :

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig264300 30
 0492 :

【化 4 1】

NGEIVSLAEK EAFSAKIADK NIGCKIENKQ FRHPKGYDVI ADNPIYKGSP RQDMLGLKET 60
 LEKRYFSPSD SIDNVRVQVA HNILDIEKIL AEYITNAVYS FDNIAGFGKD IIGDDFSPVY 120
 TYDKFEKSDR YEYFKNLLNN SRLGYYGQAF FECDDSKENK KKKDAIKCYN IIALLSGLRH 180
 W 181

30

(配列番号 84)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0 1 4 7】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列 :

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig874000 40
 057 :

【化 4 2】

MSKNKESYAK	GMGLKSALVS	GSKVYMTSFE	GGNDAKLEKV	VENSEIVSLA	EKESFSAEIF	60
KKNIGCKIEN	KKFKHPKRYD	VIADNPLYKG	SVRQDMLGLK	ETLEKRYFNS	ADGTDNVCIQ	120
VIHNILDIEK	ILAEYITNAV	YSFDNIAGFG	EDIIGMGGFK	PIYTYKQFKE	PKYNNKFDD	180
ILNNSRLGYY	GKAFFEKNDL	KHNPNNKKRD	KNPYILKYDN	ECYIIALLS	GLRHWNIHSH	240
AKDDLVSYRW	LYNLDLSILNR	EYISTLNYLY	DDIADELTES	FSKNSSANVN	YIAETLNIDP	300
SEFAQQYFRF	SIMKEQKNMG	FNVSKLREIM	LDRKELSDIR	DNHRVFDISIR	SKLYTMMDFV	360
IYRYIEEAA	KTEAENRNLP	ENEKKISEKD	FFVINLRGSF	DENQKEKLYI	EEAKRLWEKL	420
KDIMLKIKEF	RGEKVKEYKK					440

(配列番号 85)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0148】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig478100
0489 :

【化 4 3】

LDKQLDYEYI	RTLNYMFNDI	ADELTRTFESK	NSAANVNYIA	ETLNIDPNKF	AEQYFRFSIM	60
KEQKNLGFNL	TKLRESMLDR	RELSDIRDNH	NVFDISIRPKL	YTMMDFVIYK	HYIDEAKKTE	120
AENKSLPDDR	KNLSEKD					137

20

(配列番号 86)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0149】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig121440
00352 :

【化 4 4】

RMGEPVANTK	RVMIDAVKI	LGTDLSDDEL	KEMADSFCKD	SDGNLLKKGK	HGMRNFITNN	60
VIKKNRFHYL	IRYGDPAHLH	EIAKNEA				87

30

(配列番号 87)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0150】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d Gut__metagenome__contig559000
0448 :

【化 4 5】

VHNNEEKDLI	KYTWLYNLDK	YLDAEYITTL	NYMYNDIGDE	LTDSFSKNSA	ANINYIAETL	60
GIDPKTFAEQ	YFRFSIMKEQ	KNLGFNLTKL	REVMLDRKDM	SEIRENHNDF	DSIRAKVYTM	120
MDFVIYRYII	EAAKVNAAN	KSLPDNEKSL	SEKDIFVISL	RGSFNEDQKD	RLYDEAQRLL	180
WSKVGLMLK	IKKFRGKPTR	KYKNMGTPRI	RRLIPEGRDI	STFSKLMYAL	TMFLDGKEIN	240
DLTTTLINKF	DNIQSFLKVM	PLIGVNAKFA	EEYSFFNNSE	KIADELRLIK	SFARMGEPVA	300
DARRAMYIDA	IRILGTDLSD	DELKALADSF	SLDENGKLG	KGKHGMRNFI	INNVITNKRF	360
HYLIRYGNPV	HLHEIAKNEA	VVKFVLGRIA	DIQKQOGQNG	KNQIDRYEYET	CIGK	414

40

(配列番号 88)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0151】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

50

C a s R X / C a s 1 3 d G u t _ m e t a g e n o m e _ c o n t i g 5 2 5 0 0 0
3 4 9 :

【化46】

MSKKENRKSX VKGLGLKSTL VSDSKVYLTT FADGSSNAKLE KCVENNKIIC ISNDKEAFAA	60
SIANKNVGYK IKNDEKFRHP KGYDIISNNP LLHNSVQQD MLGLKNVLEK RYFGKSSGGD	120
NNLCIQIIHN IIDIEKILSE YIPNVVYAFN NIAGFKDEHN NIIDIIGTQT YNSSYTYADF	180
SKDKSDKKYI EFQKLLKNKR LGYWGKAFFT GQGNNAKVRQ ENQCFHIIAL LISLRNWATH	240
SNELDKHTKR TWLYKLDDTN IILNAEYVKTL NYLYDTIADE LTKSFSKNGA VNVNYLAKKY	300
NIKDDLPGFS EQYFRFSIMK EQKNLGFNIS KLRENMLDFK DMSVI	345

(配列番号 89)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0152】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列：

C a s R X / C a s 1 3 d G u t _ m e t a g e n o m e _ c o n t i g 7 2 2 9 0 0
0 3 0 2 :

【化47】

KKISSLTKFC LGESDEKCLK ALAKKSLEEL KTTNSKLYEN YIKYSDERKA EEAKRQINRE	60
RAKTAMNAHL RNTKWNIMY GQLKDLADSK SRICSEFRNK AAHLEVARYA HMYINDISEV	120
KSYFRLYHYI MQRRIIDVIE NNPKAKYEGK VKVYFEDVKK NKKYNKNLLK LMCVFGYCI	180
PREKNLSIEQ MFDMNETDNS DKKKEK	206

20

(配列番号 90)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0153】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列：

C a s R X / C a s 1 3 d G u t _ m e t a g e n o m e _ c o n t i g 3 2 2 7 0 0
0 3 4 3 :

【化48】

IGDISEVNSY FQLYHYIMQR ILIDKIGSKT TGRAKEYFDS VIVNKKYDDR LLKLLCSPLG	60
YCLTRYKDLS IEALFDMNEA AKYDKLNKER KNKKK	95

30

(配列番号 91)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0154】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列：

C a s R X / C a s 1 3 d G u t _ m e t a g e n o m e _ c o n t i g 7 0 3 0 0 0
0 4 6 9 :

【化49】

SIRSKLYTMM DFVIYRYIIE ESAKAAAENK PSESDFSIVR LRGSFNENQK EELYIEEAER	60
LWKKFGEIML KIKEFRGEKV KEYKKEVPRI ERILPHGKDI SAFSKLMYML SMFLD	115

40

(配列番号 92)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0155】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列：

C a s R X / C a s 1 3 d g u t _ m e t a g e n o m e _ P 1 7 E 0 k 2 1 2 0 1 4
0 9 2 0、c 8 7 0 0 0 0 4 3 :

【化50】

MYFSKMIYML TYFLDGKEIN DLLTTLISKF DNIKEFLKIM KSSAVDVECE LTAGYKLFND	60
SQRITNELFI VKNIASMRKP AASAKLTMFR DALTLIGIDD KITDDRISEI LKLKEKGGI	120
HGLRNFITNN VISSRFVYL IKYANAQKIR EVAKNEKVVVM FVLGGIPDTQ IERYKSCVE	180
FPMNSSLLEA KRSELARMIK NISFDDFKNV KQQAAGRENV AKERAKAVIG LYLT	234

(配列番号 93)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0156】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ emb | OBVH01003037.1、ヒト腸内メタゲノム配列 (WGS コンティグ emb | OBXZ01000094.1 | および emb | OBF01000033.1 | にも見いだされる) :

【化51】

MAKKKRITAK ERKQNHRELL MKKADSNAEK EKAKKPVVEN KPDTAISKDN TPKPNKEIKK	60
SKAKLAGVKW VIKANDDVAY ISSFGKGNNS VLEKRIMGDV SSVNKNDSHM YVNPKYTKKN	120
YEIKNGFSSG SSLVTYPNKP DKNSGMDALC LKPYFEKDFE GHIFTDNMHI QAIYNIFDIE	180
KILAKHITNI IYTVNSFDRN YNQSGNDTIG FGLNRYVPYS EYGGGKDSNG EPKNQSKWEK	240
RDNFIKIFYNE SKPHLGYEN IFYDHGEPIS EEKFYNYLNI LNFIRNNTFH YKDDDIELYS	300
ENYSEEFVFI NCLNKFVKNK FKNVNKNFIS NEKNNLYIIL NAYGKDTENV EVVKKYSKEL	360
YKLSVLKTNK NLGVNVKCLR ESAIEYGYCP LPYDKEKEVA KLSSVKHKLY KTYDFVITHY	420
LNSNDKLLLE IVETLRSLKN DDEKENVYKK YAEKLFKADD VINPIKAIK LFARKGNKLF	480
KEKIIKKEY IEDVSDKNI YDFTKVIFFM TCFLDGKEIN DLLTNIISKL QVIEDHNNVI	540
KFISNNKDAV YKDYSKYAI FRNAGKIATE LEAIXIARM ENKIENAPQE PLLKDALLSL	600
GVSDDTKVLN NTYNKYFDSK ETKDKQSQKV STFLMNNVIN NNRFKYVIKY INPADINGLA	660
KNRYLVKFFVL SKIPEEQIDS YYKLFSNEEE PGCEEKIKLL TKKISKLNFO TLFENNKIPN	720
VEKEKKKAI TLYFTIVYIL VKNLVNINGL YTLALYFVER DGYFYKDICG KKDKKKSND	780
VDYLLPEIF SGSKYRETK NLKLPKEKDR DIMKKYLPND KDREKYNKFF TAYRNNIVHL	840
NIIAKLSELT KNIDKDINSY FDIYHYCTQR VMFNKYCKEN DVVLAKMKDL AHIKSDCNEF	900
SSKHTYPFSS AVLRFMNLPF AYNVPRFKNL SYKKFFDKQ	939

(配列番号 94)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0157】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ tpg | DJXD01000002.1 | (培養されていない Ruminococcus アセンブリ、UBA7013、ヒツジ腸内メタゲノム由来) :

【化52-1】

MKKQKSKKTV SKTSGLKEAL SVQGTVIMTS FGKGNMANLS YKIPSSQKPQ NLNSSAGLKN	60
VEVSGKKIKF QGRHPKIATT DNPLFKPQPG MDLLCLKDKL EMHYFGKTFD DNIHIQLIYQ	120
ILDIEKILAV HVNNIVFTLD NVLHPQKEEL TEDFIGAGGW RINLDYQTLR GQTNKYDRFK	180
NYIKRKELLY FGEAFYHENE RRYEEDIFAI LTLLSALRQF CFHSDLSSDE SDHVNSFWLY	240
QLEDQLSDEF KETLSILWEE VTERIDSEFL KTNTVNLHIL CHVFPKESKE TIVRAYEFL	300
IKKSFKNMGF SIKKLRREIML EQSDLKSFKE DKYNSVRAKL YKLFDFIITY YYDHHAPEKE	360
ALVSSLRSSL TEENKEEIIYI KTARTLASAL GADFKKAAAD VNAKNIRDYQ KKANDYRISF	420

10

20

30

40

【化52-2】

EDIKIGNGTGI GYFSELIYML TLLLDGKEIN DLLTTLINKF DNIISFIDIL KKLNLFEKFK	480
PEYADFFNMT NCRYTLEELR VINSIARMQK PSADARKIMY RDALRILGMD NRPDEEIDRE	540
LERTMPVGAD GKFIKKGQGF RNFIASNVIE SSRFHYLVRY NNPBKTRTLV KNPVVKFVL	600
EGIPETQIKR YFDVCKQEI PPTSDKSAQI DVLARIISSV DYKIFEDVPO SAKINKDDPS	660
RNFSALKKQ RYQAIVSLYL TVMYLITKNL VYVNSRYVIA FHCLERDAFL HGVTLPKMKN	720
KIVYSQLTTH LLTDKNYTTY GHLKNQKGR KQYVLVKNL QNSDITAVSS FRNIVAHISV	780
VRNSNEYISG IGELHSYFEL YHYLVQSMIA KNNWYDTSHQ PKTAEYLNLL KKHHTYCKDF	840
VKAYCIPFGY VVPRYKNLTI NELFDRNNPN PEPKEEV	877

(配列番号 95)

10

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0158】

CasRX/Cas13dメタゲノムヒット(タンパク質受託なし)の例示的なダイレクトリピート配列: コンティグ t p g | D J X D 0 1 0 0 0 0 2 . 1 | (培養されていない R u m i n o c o c c u s アセンブリ、U B A 7 0 1 3、ヒツジ腸内メタゲノム由来) (配列番号95)は、核酸配列:

CasRX/Cas13d DR:

【化53】

caactacaac cccgtaaaaa tacgggggttc tgaaac

36

20

【0159】

(配列番号96)

を含むまたはそれからなる。

【0160】

例示的なCasRX/Cas13dタンパク質は、配列:

CasRX/Cas13dメタゲノムヒット(タンパク質受託なし): コンティグ O G Z C 0 1 0 0 0 6 3 9 . 1 (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ):

【化54】

MKKKNIRATR EALKAQKIKK SQENEALKKQ KLAEEAAQKR REELEKKNLA QWEETSAEGR	60
RSRVKAVGVK SVFVVGDDLY LATFGNGNET VLEKKITPDG KITTFPEEET FTAKLKFAQT	120
EPTVATSIGI SNGRIVLPEI SVDNPLHTTM QKNTIKRSAG EDILQLKDVL ENRYFDRSFN	180
DDLHIRLIYN ILDIEKILAE YTTNAVFAID NVSGCSDDFL SNFSTRNQWD EFQNPQHRE	240
HFGNKDNVIC SVKKQQLFF NFFKNNRIGY FGKAFFHAES ERKIVKTEK EVYHILTLLIG	300
SLRQWITHST EGGISRLWLY QLEDALSREY QETMNNCYN S TIYGLQKDFE KTNAPNLNFL	360
AEILGKNASE LAEPYFRFII TKEYKNLGF S IKTLREMLLD QPDLQEI REN HNVYDSIRSK	420
LYKMIDFVLV YAYSNERKSK ADALASNLRS AITEDAKKRI YQNEADQLWT SYQELFKRIR	480
GFKGAQVKEY SSKNMPPIQ KQIQNILKPA EQVTYFTKLM YLLTMFLDGK EINDLLTTLI	540
NKFDNISSLL KTMEQLELQT TFKEDYTFEQ QSSRLCKEIT QLKSFARMGN PISNLKEVMM	600
VDAIQILGTE KSEQELQ SMA CFFFRDKNGK KLNTGEHGMR NFIGNNVISN TRFQYLIRYG	660
NPQKLHTLSQ NETVVRVLS RIAKNQRVQG MNGKNQIDRY YETCGGTNSW SVSEEEKINF	720
LCKILTNSY DQFQDVKQSG AETAEERK KERYKAIISL YLTVLYQLIK NLVNINARIYI	780
IAFHCLERDA ILYSSKFNTS INLKKRYTAL TEMILGYETD EKARRKTRT VYEKAEAAKN	840
RHLKNVKNWC KTRENLENAD KNAIVAFRNI VAHLWIIRDA DRFITGMGAM KRYFDCYHYL	900
LQRELGYILE KSNQGSEYTK KSLEKVQYH SYCKDFLHML CLPFAYCIPR YKNLSIAELF	960
DRHEPEAEPK EEASSVNNSQ FITT	984

30

40

(配列番号 97)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0161】

例示的なCasRX/Cas13dタンパク質は、配列:

50

C a s R X / C a s 1 3 dメタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ e m b
| O H B M 0 1 0 0 0 7 6 4 . 1 (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ) :

【化55】

XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	60	
XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	120	
XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	180	
XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXHPLQKRYR	YLTSTNLKSF	240	
ETYKNNLVNK	KKFDLDRVKK	IPQLAYFGSA	FYNTPEDTSA	KITKTKIKSN	EIYYTFMLL	300	
STARNFSAHY	LDRNRAKSSD	AEDFDGTSVI	MYNLDNEELY	KKLYNKKVHM	ALTGMKKVLD	360	
ANFNKKEVEHL	NNSFIKNSAK	DFVILCEVLG	IKSRDEKTKF	VKDYYDFVVR	KNYKHLGFSV	420	10
KELRELLFAN	HDSNKYIKEF	DKISNKKFDS	VRSRLNRLAD	YIYYDYNNKN	NAKVSDLVKY	480	
LRAAADDEQK	KKIYLNESIN	LVKSGILERI	KKILPKLNGK	IIGNMQPDST	ITASMLHNTG	540	
KDWHPISENA	HYFTKWIYTL	TLFMDGKEIN	DLVTTLINKF	DNIASFIEVL	KSQSVCTHFS	600	
EERKMFDISA	EICSELSAMN	SFARMEAPGA	SSKRAMFVEA	ARILGDNRSK	EELEEFDTL	660	
FDKSASKKEK	GFRNFIRNNV	VDSNRFKYLT	RYTDTSSVKA	FSNNKALVKF	AIKDIPQEQI	720	
LRYYNSCFG	SERYNDGMS	DKLVEAIGKI	NLMQFNGVIQ	QADRNMPLPEE	KKKANAQKEK	780	
YKSIIRLYLT	VCYLFFKNLV	YVNSRYYSAF	YNLEKDRSLF	EINGELKPTG	KFDEGHYTG	840	
VKLFIDNGWI	NPRASAYLTV	NLANSDETAI	RTFRNTAEHL	EALRNADKYL	NDLKQFDSYF	900	
EIYHYITQRN	IKEKCEMLKE	QTVKYNNDDL	KYHGYSKDFV	KALCVPFQYN	LPRFKNLSID	960	
ALFDKNDKRE	KLKKGFE					978	20

(配列番号 98)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0162】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列 :

C a s R X / C a s 1 3 dメタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ e m b
| O H C P 0 1 0 0 0 0 4 4 . 1 (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ) :

【化56-1】

MAKKITAKQK	REEKERLNKQ	KWAKNDSVII	VPETKEEIKT	GEIQDNNRKR	SRQKSQAKAM	60	
GLKAVLSFDN	KIAIASFVSS	KNAKSSHIER	ITDKEGTTIS	VNSKMFESSV	NKRDNIEKR	120	30
ITIEEPQQDG	TIKKEEKGVK	STTCNPYFKV	GGKDYIGIKE	IAEEHFFGRA	FPNENLRVQI	180	
AYNIFDVQKI	LGTFVNMIIY	SFYNSLRDEV	QSDNDVIGML	YSISDYDRQK	ETETFLQAKS	240	
LLKQTEAYYA	YFDDVFKNK	KPDKNKEGDN	SKQYQENLRH	NFNILRVLSF	LRQICMHAEV	300	
HVSDDEGCTR	TQNYTDSLEA	LFNISKAFGK	KMPELKTLD	NIYSKGINAI	NDEFVKNGKN	360	
NLYILSKVYP	NEKREVLRE	YVNFVCKEG	SNIGISTRKL	KETMIAQNMP	SLKEENTYRN	420	
KLYTVMNFIL	VRELKNCATI	REQMIKELRA	NMDEEEGRDR	IYSKYAKEIY	LYVKDKLKL	480	
LNVFKEEAEG	IIIPGKEDPV	KFSHGKLDK	EIESFCLTTK	NTEDITKVIY	FLCKFLDGKE	540	
INELCCAMMN	KLDGISDLIE	TAKQCGEDVE	FVDQFKLSK	CATMSNQIRI	VKNISRKKE	600	
MTIDNDTIFL	DALELLGRKI	EKYQKDKNGD	YVKDEKGGKV	YTKDYNFQD	MFFEGKNHRV	660	
RNFVSNNVIK	SKWFSYVVRY	NKPAECQALM	RNSKLVKFAL	DELPDSQIEK	YYISVFGEKS	720	40
SSSNEEMRRE	LLKKLCDFSV	RGFLDEIVLL	SEDEMKQKDK	FSEKEKKKSL	IRLYLTIIVYL	780	
ITKSMVKINT	RFSIACATYE	RDYILLCQSE	KAERAWEKGA	TAFALTRKFL	NHDKPTFEQY	840	
YTREREISAM	PQEKREKLRK	ENDQLLKKTH	YSKHAYCYIV	DNVNNLTGAV	ANDNGRGLPC	900	
LSEKNDNANL	FLEMRNKIVH	LNVVHDMVKY	INEIKNITSY	YAFFCYVLQR	MIIGNNSNEQ	960	
NKFKAKYSKT	LQEFGTYSKD	LMWVNLNPF	YNLPRYKNLS	NEQLFYDEEE	RMEKIVGRKN	1020	

【化56-2】

DSR

1023 (配列番号 99)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0163】

50

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ emb
| OGDFO1008514.1 | (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ) :

【化57】

MTETKPKRED	IAKTPAAKSR	SKAAGLKSTF	AVNGSVLLTS	FGRGNDAVPE	KLITEKAVSE	60	
INTVKPRFSV	EKPATSYSSS	FGIKSHISAT	ADNPLAGRAP	VGEDAIHAKE	VLEQRVFGKT	120	
FSDDNIIHQ	IYNILDIRKI	LSTYANNVVF	TINSMRRLDE	YDREQDYLYG	LYTGNSYERL	180	
LDIADKYAVD	GEDWRNTAAG	ISNDFEKKQF	QTINGFWDLL	DMIEPYMCYF	SEAFFCETTV	240	
KDPDSGRIVP	CLEQRSDGDI	YNILRILSIV	RQTCMHDNAS	MRTVMFTLGQ	NSVRDRKNGF	300	
DELAELLDYL	YDEKIDIVNR	DFLRNQNKNI	ELLSRIYGSS	ADSPERDRLV	QNFYDFRVLS	360	10
QDKNLGFSIK	KLREKLLDSP	ALSVVRSKKY	DTMRSKIYSL	IDFMIYRKFES	ENHVAVDVDFV	420	
EELRSLLTED	EKESAYSRWA	ETLINDGFAQ	EILVKLLPQT	DPAVIGKIKG	KKLLNDSIAG	480	
IKLKKDASFF	TKIINVLCMF	QDGKEINELV	SSLVNKFANI	QSFVDVMRSQ	GIDSGFTADY	540	
AMFAESGRIS	RELHILKGIA	RMQHSIAGLG	DVKIYGSDDK	FHGVSRRVYT	DAAYILGFGE	600	
RSEDNDGYVD	DYVSSKLLGG	ADKNLRNFIT	NNVIKNRRFL	YTVRYMNPKR	AKKLVQNDAL	660	
VVLALSGIPE	TQIDRYKSC	IEKRSFNPDL	NEKIAALSEM	ITTLKIDDFE	DVKQNPENNA	720	
NYEAKKNQRI	SKERYKACIG	LYLTVLYLIC	KNLVKINARY	SIAIGCLERD	TQLHGVDFKG	780	
AAYMTRDVFI	AKGWINPKKP	TVKSIKEQYA	FLTPYIFTTY	RNMIAHLAAV	TNAYKYIPQM	840	
DRFKSWFHLY	HTVIQHSLIQ	QYFYDRDYGR	KGAPVVSERV	LQLLEQCREH	SNYSRDLLEH	900	
LNLPGYNLPL	RYLNLSSSEKY	FDANAI				926	20

【0164】

(配列番号100)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0165】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ emb
| OGPNO1002610.1 | (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ) :

【化58-1】

MAKKITAKQK	REEKERLNKQ	KWAKQDTPVV	PKSKTEEKPV	AASDDKLLKT	TQVKKVQTKS	60	
KAKAMGLKTV	LSFDDKIAIA	SFVNDKKTCL	PHIERITDKS	GTTIHENARM	FDSSVDEQNV	120	30
NIEKRMTIEE	KQNDGTFKKD	EKDKVATICN	PYFKTCGKDY	IGIKDVAEKY	FFGKTFFPEN	180	
LRVQIAYNVF	DIQKILGTYY	NNIIYSFYNL	RRDGKSDVDI	IGSLYAFADF	DNQLKDKPAF	240	
REAKDLLKNT	EAYFSYFGDV	FKKSKKGKKD	ENNEDYEKNL	RHNFNVLRLV	SFLRQICTHA	300	
YVKCTGGAKN	NGDSTKVEAE	SLDALFNITE	YFAKTAPELS	KTINEIYKEG	IDRINNDVFT	360	
NGKNNLYILS	KVYPDMQRNE	LVKKYYQFVV	CKEGNVGIN	TRKLLKESIS	QHPWITTPQD	420	
NNKANDYESC	RHKLYTIMCF	ILVAELDAHE	SIRDNMVAEL	RANMDGDDGR	DAIYEKYAKD	480	
IYHIVKDKLL	AMQKVDFEEL	VPVKVEGKND	PQQFTHGKLG	KKEIESFCLS	DKNTSDIAKV	540	
VYFLCNFLDG	KEINELCCAM	MNKFDFGIGL	IDTAKQCGEE	VKFIEEFACL	SNCRKITNDI	600	
RVAKSISKMK	NKVNIDNDII	YLDIAIELLGR	KIEKYQKDEN	GKILLGTDGK	RLYTQYKYF	660	
NDMFFNAGNH	KVRNFIANNV	MQSKWFFYVV	RYNKPAECQI	IMRNKTLVKF	TLDDLPLDQI	720	40
QRYYSVFGD	NNMPAVDEMR	KRLLDKINQF	SVRGFLDELD	EIVLMSDEES	KRNKSSEKEQ	780	
KKSLIRLYLT	IAYLITKSMV	KINTRFSIAC	AMYERDYALL	CQSEMKGGPW	DGGAQALAVT	840	

【化58-2】

RKFLNHDREV	FDRYCAREAE	IARLPSEERK	PLRKANDKLL	KQTHYTNHSY	TYIVNNLNSF	900	
TDIDYCAKDV	GLPAPNDKND	NASILGEMRN	DIAHLNIVHD	MVKYIEELKD	ISSYYAFYCY	960	
VLQRRVLGKD	PNCQNKFKAK	YAKELNDYGT	YNKMLMWMNL	LPPAYNLPRY	KNLSSEFLFY	1020	
DMEYNKKDDE						1030	

(配列番号 101)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 6 6 】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列：

C a s R X / C a s 1 3 d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ e m b
| O B L I 0 1 0 2 0 2 4 4 および e m b | O B L I 0 1 0 3 8 6 7 9 (ブタ腸内メタゲ
ノム由来) 由来：

【 化 5 9 】

MAKKITAKQR	REERERQNKQ	KWAKKQADAT	AVFECEADIK	PADSKDEDCT	NIYIKREKKK	60	
TQAKAMGLKT	VLGFDNKIAI	ASFMSKDSK	SSHIERITDP	NGKTIREDRV	MFDSNVDECS	120	
INLEKRMTVE	ERQKDGTIKK	DEKDVKSTIC	NPYSNECGKD	YIGIKSVAEE	LFFGRTFPND	180	
NLRVQIAYNI	FDIQKILGTY	INNIIYSFYN	LSRDESQSDN	DVIGTLYMLK	DFDGQKETDT	240	10
FRQARALLER	TEAYYSYFDN	VFKKIDKNKK	KSDDCRERN	EILRYNFNVL	RVLSFLRQIC	300	
AHAQVKISNE	HDREKGGGLV	DSLDAFNIS	RFFDAVAPEL	NEVINSVYSK	GIDDINDNFV	360	
KNGKNNFYIL	SKIYPEVARE	DLLREYYYYFV	VSKEGNNIGI	STKKLKEAII	VQDMSYIKSE	420	
DYDTYRNKLY	TVLCFILVKE	LNERTTIREQ	MVADLRANMN	GDIGREDIYS	KYAKIIYAQV	480	
KPRFDTMKS	FEEEAQDVIV	PDKKKPVKFS	HGKLDKNEIE	RFCITSANTD	SVAKIIYFLC	540	
KFLDGKEINE	LCCAMMNKLD	GINDLIETAE	QCGAKVEFVD	KFSVLSNCET	ISDQIRIVKS	600	
ISKMKKEIAI	DNDTIFLDAL	ELLGRKIDKY	KKDATGKYLK	DENGKYLISK	EYDDFQYMF	660	
KDSHRVRNFI	SNSVIKSKWF	SYIVRYNQPS	ECRAIMKNKT	LVKFALDELP	DLQIQRYFVA	720	
LYGDEDLPSY	GEMRKILLKK	LHDFSIGKFL	DEIVLLSDLD	MESQDKYCEK	EQKKSFLRLY	780	
LTAYLITKS	MVKINTRFSI	ACATYERDYA	LLCASNKQER	AWSSGATALA	LTRRFLNQDK	840	20
LIFEKHYARE	GEISKLPKEE	RKAMRKVNDQ	LLKRTHFSKH	SYCYIVDNVN	RLTGGE CRTD	900	
KRVLPVLNEK	NDNAGILLDF	RKTIAHLNVV	HKMVDYVDEI	KGITSYYAFF	CYVLQRLVVG	960	
NNLNEKNAIK	EKYSATVKSF	GTYSKDFMWL	INLPFAYNLP	RYKNLSNEQL	FYDEEERNET	1020	
EEQIDRL						1027	

(配列番号 102)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 6 7 】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列：

C a s R X / C a s 1 3 d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ O I Z 30
X 0 1 0 0 0 4 2 7 . 1 :

【 化 6 0 - 1 】

MAKKKKTARQ	LREEMQQQRK	QAIQKQQR	QEKAAAARET	AAPEQPAAAP	VPKRQRKSLA	60	
KAAGLKSNEI	LDPQRRTVM	TAFGQGSTAI	LEKQIVDRAI	SDLQPQQFQ	VEPASAAYR	120	
LKNSRVRFPN	VTADDPYR	KDGGFVPGMD	ALRRKNVLEQ	RFFGKSFADN	IHIQMIYSIL	180	
DIHKILAAAS	GHIVHLLNIV	NGSKDRDFIG	MLAAHVLYNE	LNEEAKRSIA	DFCKSPRLIY	240	
YSAAFYETLD	NGKSERRSNE	DIFNILALMT	CLRNFSHHS	IAIKVKDYSA	AGLYNLRLG	300	
PDMKMLDTF	YTEAFIQLNQ	SFQDHNTTNL	TCLFDILNIS	DSARQQLAE	EFYRYVVFKE	360	
QKNLGFVSRK	LREEMLLLPD	AAVIADKRYD	TCRSKLYNLM	DFLILRVYRT	GRADRCDKLP	420	
EALRAALTDE	EKAVVYHKEA	LSLWNEMRTL	ILDGLLPQMT	PENLSRLSGQ	KRKGELSLDD	480	40
AMLKECLYEP	GPVPEDAAP	EANAEIFCRM	IYLATLFMDG	KEINTLLTTL	ISKFENIAAF	540	
LQTMEQLNIE	AELGPEYAMF	TRSRVAEQL	RVINSFALMK	KPQVNAKQQL	YRAAVTLLGT	600	
EDPDGVTDEM	LCIDPVTGKM	LPPNQRRHGD	TGLRNFIAANN	VVESRRFQYL	IRYSDPAQLH	660	

【化60-2】

QLASNKKLVR FVLSSIPDTQ INRYYETCGQ TRLAGRAAKV EFLTDMIAAI RFDQFRDVNQ	720
KERGANTQKE RYKAMLGLYQ TVLYLAVKNL VNINARVMA FHCVERDMFL YDGELTDPKG	780
ESVSAFLAVN GKKGVQPQYL LLTQLFIRRD YLKRSAEQI QHNMENISDR LLREYRNAVA	840
HLNVIAHLAD YSADMREITS YYGLYHYLMQ RHLFKRHAWQ IRQPERPTEE EQKLIQEQQ	900
QLAWEKALFD KTLQYHSYNK DLVKALNAPF GYNLARYKNL SIEPLFSKEA APAAEIKATH	960
A	961

(配列番号 103)

を含み得るまたはそれからなり得る。

10

【0168】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ OCT
W011587266.1:

【化61】

MKQNDRENNN KIKKSAKAV GVKSLARLSD GSTVSSFGK GAAAELESLLI TGGEIRKLSLSD	60
KAILLEITDDT QNKNAYNVKS SRIPNLTART DKLSDKSGMD DLGFKRELEL EVFGQCFFDS	120
IHIQIAHAVF DIQKSLAAVI PNVLYTLNLL DRSYSTDNTS DKKDIIGNTL NYQHSYSEFN	180
VEKRGEFTEY YNAAKDRFSY FPDILCVLEK VNGKDRYQPK SEKDAFNVLS SVNMLRNSLF	240
HFAPKSNDBG ARIAVFKNQF DSDFSHITST VNKIYSAKIA GVNENFLNNE GNNLYIILKA	300
TNWDIKKIVP QLYRFSVLKS DKNMGFNMRK LREFAVESKN IDLSRLNDKF LTNNRKKLYK	360
VIDFIIYYHL NKVLKDSFVD DFVAALRASQ SEEEKEKLYA QYSERLFADE GLKSAIKKAV	420
DMISDTKSNL FKMKTPLDKA LIENIKVNSD ASDFCCLIYV FTRFLDGKEI NILLNSLIKK	480
FQDIHSFNTT VKKLSENLLI INADYVDDYS LFEQSGTVAR ELMLIKSISK MDFGLDNINL	540
SFMYDDALRT LGVSDENLPE VKREYFGGTK NLSAYIRNNV LENRRFKYVI KYIHPSDVQK	600
IACNKAIAGF VLNRMPTQI KRYYDSLIN KATDIQAQAK ALLDCITGIS FDAIKDDKHL	660
HKSKEKSPQR SADREKRAM LTLYYTIVYI FVKQMLHINS LYTIGFFYLE RDQRFIYSRA	720
KKENKNPSKN SYLNDFRSVT AYFIPSEIMK RIEKNENKGF LEDFEALWNS CGKTSRLRKE	780
DVLLYARYIS PDHALKNYKM ILNSYRNKIA HINVIMSAGK YTGGIKRMDS YFSVFQHLVQ	840
CDILSNPNK GKCFESESLK PLLLDKMFDFG TDEKLYSKRL TRALNIPFGY NVPRYKNLTF	900

20

30

EKIYLKSSIN E

911 (配列番号104)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0169】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ emb
| OGNF01009141.1:

【化62-1】

MADIDKKKSS AKAAGLKSTF VLENNKLLMT SFGNGNKAVI EKIIDEKVDS INEPEVFSVT	60
PCDKKFELQP AKRGLAADSL VDNPLKSKKT AGDDAIHSRK FLERQFFDGN TFNDNIHIQL	120
IYNILDIEKI LSVHVNDIVY SVNNILSRGE GMEYNDYIGT LNLKSFETYK NNLVNKKKFD	180
LDRVKKIPQL AYFGSAFYNT PEDTSAKITK TKIKSNEEII YTFMLLSTAR NFSAHYLDRN	240
RAKSSDAEDF DGTSMVIMYNL DNEELYKKLY NKKVHMALTG MKKVLDFANFN KKVEHLNNSF	300
IKNSAKDFVI LCEVLGIKSR DEKTKFVKDY YDFVVRKNYK HLGFSVKELR ELLFANHDSN	360
KYIKEFDKIS NKKFDSVRSR LNRLADYIIY DYYNKNNAKV SDLVKYLRAA ADDEQKKKIY	420
LNESINLVKS GILERIKKIL PKLNGKIIGN MQPDSTITAS MLHNTGKDWL PISENAHYFT	480
KWIYTLTLEM DGKEINDLVT TLINKFDNIA SFIEVLKSQS VCTHFSEERK MFIDSAEICS	540
ELSAMNSFAR MEAPGASSKR AMFVEAARIL GDNRSKEELE EYFDTLFDKS ASKKEKGFERN	600
FIRNNVVDNS RFKYLTRYTD TSSVKAFSNN KALVKFAIKD IPQEQILRYY NSCFGASERY	660
YNDGMSDKLV EAIGKINLMQ FNGVIQQADR NMLPEEKKA NAQKEKYKSI IRLYLTVCYL	720

40

【化62-2】

FFKNLVYVNS RYYSAFYNLE KDRSLFEING ELKPTGKFDE GHYTGLVKLF IDNGWINPRA	780
SAYLTVNLAN SDETAIRTFR NTAEHLEALR NADKYLNDLK QFDSYFEIYH YITQRNIKEK	840
CEMLKEQTVK YNNDLLKYHG YSKDFVKALC VPFYGNLPRF KNLSIDALFD KNDKREKLLK	900
GFED	904

(配列番号 105)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0170】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

10

CasRX / Cas13d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ emb
| O I E N 0 1 0 0 2 1 9 6 . 1 :

【化63】

MERQKRKMS KSKMAGVKS FVIGDELLMT SFGDGDDAVL EKDIDENGVV NDCRNPAAYD	60
AVYGTDSIRV KKTNNNIRAK VNNPLAKSNI RSEESALFRT RVNEYKREQK DKYETLFFGK	120
TFDDNIHIQL ISKILDIEKT FSVVIGNIVY AINNLSLEQS IDRPIDIFGD KNTQGISLRE	180
DNDYLKTMPL RCEYLPHNIL NSDSDNNSKM NYNKVNKKE EKDNRRNENI EKLLKALEVI	240
KIIRVDSFHG VDGIRKGDQKF PRSKYNLAVN YNEEIQTIS EPFNRKVEEV QQDFYRNSCV	300
NIDFLKEIMY GSNYTRGSD SLECSYFNFA ILKQNKMMGF SITSIRECLL DLYELNFESM	360
QNLRRPRANSF CDFLIYDYC KNESERANLV DCLRSAASEE EKKNIFYQTA ERVKEKFRNA	420
FNRI SRFDAS YIKNSREKNL SGGSSLPKYS FIEGFTKRSK KINDNDEKNA DLFCNMLYYL	480
AQFLDGKEIN IFLTSHNIF QNIDSFLKVM KEKGMCKFKQ KDFKMFHAG HVAKKIEIVI	540
SLAKMKKTLT FYNAQALKDA VTILGVSKKH QYLDMNSYLD FYMFDNRSGA TGKNAGKDHN	600
LRNFLVSNVI RSRKFNYLSR YSNLAEVKKL AQNPSLVQFV LSRIEPLIC RYYESSQGIS	660
SEGITIDEQI KKLTIIVDM NIDSFENINN GEIGMRYSKA TPQSIERRNQ MRVCVGLYLN	720
VLYQIEKNLM NVNARYVLAF AFAERDALML NFTLEECKKN KKRSSGGFSF IEMTQFFIDK	780
KLFKVATEAI KKNVLKNGN PESLNHIPGE YICKNMEGYH ENTVRNFRNM VAHLTAVARV	840
PLYISEVTQI DSYYALYHYC MQMNIQIE QSGKILDNIK LKNALENARV HRTYSKDAVK	900
YLCLPFAYNI SRYKALTIKD LFDWTEYSCK KDE	933

20

(配列番号 106)

30

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0171】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d メタゲノムヒット (タンパク質受託なし) : コンティグ e - k
8 7 _ 1 1 0 9 2 7 3 6 :

【化64-1】

MKRQKTEFAKR IGIKSTVAYG QGKYAITTFG KGSKAETIAVR SADPPEETLF TESDATLSIH 60
 AKFAKAGRDG REFKCGDVDE TRIHTSRSEY ESLISNPAES PREDYLGLKG TLERKFFGDE 120
 YPKDNLRIQI IYSILDIQKI LGLYVEDILH FVDGLQDEPE DLVGLGLGDE KMQKLLSKAL 180
 PYMGFFGSTD VFKVTKKREE RAAADEHNAK VFRALGAIRO KLAHFKWKES LAIFGANANM 240
 PIRFFQCATG GRQLWNDVIA PLWKKRIERV RKSFLNSAK NLWVLYQVFK DDTDEKKKAR 300
 ARQYYHFSVL KEGKNLGFNL TKTREYFLDK FFPIFHSSAP DVKRKVDTFR SKFYAILDFI 360
 IYEASVSVAN SGQMKGKVPW KGAI DNALVK LREAPDEEAK EKIYNVLAAS IRNDSLFLRL 420
 KSACDKFGAE QNRPVFPNEL RNNRDIRNVR SEWLEATQDV DAAAFVQLIA FLCNFLEGE 480
 INELVTALIK KFEGIQALID LLRNLEGVDS IRFENEFALF NDDKGNMAGR IARQLRLLAS 540
 VGKMKPDMTD AKRVLYKSAL EILGAPPDEV SDEWLAENIL LDKSNNDYQK AKKTVNPFERN 600
 YIAKNVITSR SFYYLVRYAK PTAVRKLMSN PKIVRYVLKR LPEKQVASY SAIWTQSESN 660
 SNEMVKLIEM IDRLTTEIAG FSEAVLKDKK DSIVSASRES RAVNLEVERL KKLTTLYMSI 720
 AYIAVKSLVK VNARYFIAYS ALERDLYFFN EKYGEEFRLH FIPYELNGKT CQFEYLAILK 780
 YYLARDEETL KRKCEICEEI KVGCEKHKKK ANPPYEYDQE WIDKKKALNS ERKACERRLH 840
 FSTHWAQYAT KRDENMAKHP QKWYDILASH YDELLALQAT GWLATQARND AEHLNPNVEF 900

10

【化64-2】

DVYIEDLRRY PEGTPKNKDY HIGSYFEIYH YIRQRAYLEE VLAKRKEYRD SGSFTDEQLD 960
 KLQKILDDIR ARGSYDKNLL KLEYLPFAYN LPRYKNTTE ALFDDDSVSG KKRVAEWRER 1020
 EKTREAREQ RRQR 1034

20

(配列番号 107)

を含み得るまたはそれからなり得る。

CasRX / Cas13dメタゲノムヒット(タンパク質受託なし)の例示的なダイレク
 トリピート配列: コンティゲe-k87_11092736(配列番号107)は、核酸
 配列: CasRX / Cas13dダイレクトリピート1: gtgagaaagtc tcc
 ttatggg gagatgctac(配列番号108)を含むまたはそれからなる。

【0172】

例示的なCasRX / Cas13dタンパク質は、配列:

CasRX / Cas13d Ga0129306_1000735:

30

【化65】

MQKQREQQTV TDESERKKKP LKSGAKAAGL KSVFVLSEGE ELLTSFGRGN EAVPEKRVTG 60
 GTIANARTDN KEAFSAALQN KRFEVFGRTA GSSDDPLAVS RAPQDLIGA KTALEERYFG 120
 RAFADNIHQ VIYAIQDINK ILAVHANNIV YTLNLDREA DPETDDFIGS GYLTLKNTFE 180
 TYCDPAALNE REREKVTVSK QHFDAFMQNP RLAYYGNAFF RKLSKAERLA RGREIFDKES 240
 PERRQEILGS RGKNSVDDE IRALAPEWVK REERDVYSEL VLMSELRQSC FHGQKNSAR 300
 IFRLDNDLGP GVDGARELLD RLYAEKINDL RSFDKTSASS NFRLFNAYH ADNEKKKELA 360
 QEFYRFSVLK VSKNTGFSIR TLREKIIDH AAQYRDKIYD SMRKKLFSTF DFFLWRFYEE 420
 REDEAEELRA CLRAARSDEE KEQIYAEAAA SCWPSVKPFV ESVAATLCDV VKGRTKLNKL 480
 KLSADESTLV RNAIDGVRIS PRASYFTKLI YLMTFLDGGK EINDLLTTLI HAFENIDSFL 540
 SVLGSERLER TFDANYRIFA DSGVIAQELR AVNSFARMTT EPFNSKLVME EDAAQLFGMS 600
 GGLVEHADEL REYLDNKMLD KTKLRLLPDG KVDTFGRNFI ISNVTESRRF RYLVRVCEPR 660
 AVRDMSCRPL IRLTLRDMP DTILRRYYEQ SVGAATVDRE RILDTLADKL LSLRFTDFEN 720
 VNQRANAERN REKQKMMGII SLYLNVAYQI VKNLVVYNAR YTMAYHCAER DTELLNAAG 780
 EGNLLRRDRS WPARLHLP RR ALARRRDRVE VMERDVARGP EAYNRDEWLG LVRTLRRREKR 840
 VCDNLHNNYA YLCGADAEPG DASLSLLFVY RNKAAHLSVL NKGGRLSGDL KEAKSWFYVY 900
 HFLMQRVLEE EFRNTQALPE RLRELLMMAE RYRGCSKDLI KVLNLTFAYN LPRYKNLSID 960
 GRFDKNHPDP SDE 973

40

(配列番号 109)

50

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 7 3 】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列：

C a s R X / C a s 1 3 d G a 0 1 2 9 3 1 7 _ 1 0 0 8 0 6 7 :

【化 6 6 - 1】

MKKQKKSLVK	AAGLKSFAVV	GDSVYLTSFG	KGNAARLDTK	INPDNSTERY	VSDSEKHTLK	60	
INSITDELRL	LSGPFKQAE	AKNPTHKKN	EQKNTRQDML	GLKSTLEKFY	FGSTFDDNIH	120	
IQIIHNIQDI	AKILAAHSNN	AGYALDNMLA	YQGVFEFSMI	GYMGTSRTFD	NYDPNHKNNK	180	
DFFRFLKLR	LGYFGSAFYS	QKGFDFEKRS	DEEVYNICAL	MGQIRQCCFH	GKQEKYQLKW	240	
LYNFHNFKSN	KPFLDTLDKH	FDEMIDRINK	NFIKNNTDDL	IILSGLYPDM	AKKELVRLFY	300	10
DFTTVKEYKN	MGFSVKKLRE	KMLESEASD	FRDKDYDSVR	RKLYKLMDFC	IYYLYSDSE	360	
RNENLVSRLR	ESLTDENKDI	IYSKEAKIVW	NELRKKFSTI	LDNVKGSNIK	KLENVKEKFI	420	
SEDEFDDIKL	DIDISYFSKL	MYVMCYFLDG	KEINDLLTTL	VSKFDNIGSI	IEAATQIGIN	480	
IEFIDDFKFF	DRSKDISVEL	NIIRNFARMQ	APVPAKRAM	QEDAIRILGG	SEEDIFSILD	540	

【化 6 6 - 2】

DMTGYDKSGK	KLAQSKGFR	NFIINNVVES	SRFKYIVRYS	NPQKIRKLAN	NSVVVGFVLG	600	
KLPDAQIESY	FNSCLPNRVY	STPDKARESL	RDMLHNISFN	DFADVKQDDR	RATPEEKVEK	660	
ERYKAIIGLY	LTVMYHLVKN	LVYVNSRYVM	AFHCLERDAM	HYDVSLDNYR	DLIRHLISEG	720	
DSSCNHFISH	NRRMRDCIEE	NVKNSEQLIF	GKEDAVIRFR	NNVAHLSAIR	NANEYIGDIR	780	
EITSYFALYH	YLMQRKLIDD	CKVNDTAHKY	FEQLTKYKTY	VMDMVKALCS	PFGYNLPRFK	840	20
NLSIEGKFDM	HESK					854	

(配列番号 110)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 7 4 】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列：

C a s R X / C a s 1 3 d G a 0 2 2 4 4 1 5 _ 1 0 0 4 8 7 9 2 :

【化 6 7】

MSKKENRKS	YKGLGLKSTL	VSDSKVYLTT	FADGSNAKLE	KCVENNKIIC	ISNDKEAFAA	60	
SIANKNVGKY	IKNDEKFRHP	KGYDIISNNP	LLHNSVQOD	MLGLKNVLEK	RYFGKSSGGD	120	30
NNLCIQIIHN	IIDIEKILSE	YIPNVVYAFN	NIAGFRDEHN	NIIDIIGTQT	YNSSYTYADF	180	
SKDKSDKKYI	EFQKLLKNKR	LGYGKKAFFT	GQGNNAKVRQ	ENQCFHIIAL	LISLRNWATH	240	
SNELDKHTKR	TWLYKLDDTN	ILNAEYVKTL	NYLYDTIAD	LTKSFSKNGA	VNVNYLAKKY	300	
NIKDDLPGFS	EQYFRFSIMK	EQKNLGFNIS	KLRENMLDFK	DMSVIRDDHN	RYDKDRSKIY	360	
TMMDFVIYRY	YIDNNNSID	FINKLRSSID	EKSKEKLYNE	EANRLWNKLK	EYMLYIKEFN	420	
GKLASRTPDR	DGNISEFVES	LPKIHRLPR	GQKISNFSKL	MYLLTMFLDG	KEINDLLTTL	480	
INKFENIQGF	LDIMPEINVN	AKFEPEYVFF	NKSHEIAGEL	KLKGFQAQMG	EPAATLKLEM	540	
TADAIKILGT	EKEDAELIKL	AESLFDKENG	KLLGNKQHG	RNFIGNNVIK	SKRFHYLIRY	600	
GDPALHKLIA	TNKNVRFVL	GRIADMQKKQ	GQKGNQIDR	YYEVCVGNKD	IKKTIEEKID	660	
ALTDIIVNMN	YDQFEKKKAV	IENQNRGKTF	BEKNKYKRD	ABREKFKKII	SLYLTVIYHI	720	40
LKNIVNVNSR	YILGFHCLER	DKQLYIEKYN	KDKLDGFVAL	TKFCLGDEER	FEDLKAKAQA	780	
SIQALETANP	KLYAKYMYS	DEEKKEEFK	QLNRERVKNA	RNAYLKNIKN	YIMIRLQLRD	840	
QTDSSGYLCG	EFRDKVAHLE	VARHAHEYIG	NIKEVNSYFQ	LYHYIMQCRL	YDVLKNNTKA	900	
EAMVKGKAKE	YFEALEKEGT	YNDKLLKIAC	VPGYCIIPRY	KNLSMEELFD	MNEEKKFKKK	960	
APENT						965	(配列番号111)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【 0 1 7 5 】

例示的な C a s R X / C a s 1 3 d タンパク質は、配列

C a s R X / C a s 1 3 d 1 6 0 5 8 2 9 5 8 _ g e n e 4 9 8 3 4 :

50

【化68-1】

MKNSVTFKLI	QAQENKEAAR	KKAKDIAEQA	RIAKRNGVVK	KEENRINRIQ	IEIQTKKSN	60
TQNAYHLKSL	AKAAGVKSUF	AIGNDLLMTG	FGPGNDATIE	KRVFQNRATIE	TLSSPEQYSA	120
EFQNKQFKIK	GNIKVLNHST	QMEEIQTEL	QDNYNRPHFD	LLGCKNVLEQ	KYFGRTFSDN	180
IHVQIAYNIM	DIEKLLTPYI	NNIIYTLNEL	MRDNSKDDFF	GCDSHFSVAY	LYDELKAGYS	240
DRLKTKPNLS	KNIDRIWNNF	CNYMNSDSGN	TEARLAYFGE	LFYKPKETGD	AKSDYKTHLS	300
NNQKEEWELK	SDKEVYNIFA	ILCDLRHFCT	HGESITPSGK	PFYINLEKNL	FPEAKQVLNS	360
LFEEKAESLG	AEAFGKTAGK	TDVSILLKVF	EKEQASQKEQ	QALLKEYYDF	KVQRTYKNMG	420
FSIKKLREAI	MEIPDAAKFK	DDLYSSLRHK	LYGLDFILV	KHFLDTS DSE	NLQNNDFRQ	480
LRACRCEEEK	DQVYRSIAVK	VWEKVKKEL	NMFKQVVVIP	SLSKDELKQM	EMTKNETELS	540
SIETISTQAS	LFSEMIFFMT	YLLDGKEINL	LCTSLIEKFE	NIASFNEVLK	SPQIGYETKY	600
TEGYAFFKNA	DKTAKELRQV	NNMARMTRPL	GGVNTKCVMY	NEAAKILGAK	PMSKAELESV	660

10

【化68-2】

FNLDNHDYTY	SPSGKKIPNK	NFRNFIINNV	ITSRRFLYLI	RYGNPEKIRK	IAINPSIISF	720
VLKQIPDEQI	KRYYPPIGK	RTDDVTLMRD	ELGKMLQSVN	FEQFSRVNKN	QNAKQNPNGE	780
KARLQACVRL	YLTVPYLFIK	NMVNINARYV	LAFHCLEDRH	ALCFNSRKLN	DDSYNEMANK	840
FQMRKAKKE	QYEKEYKCKK	QETGTAHTTK	IEKLNQOIAY	IDKDIKNMHS	YTCRNYRNLV	900
AHLNVVSKLQ	NYVSELPNDY	QITSYFSFYH	YCMQLGLMEK	VSSKNIPLVE	SLKNEANDAQ	960
SYSAKKTLEY	FDLIEKNRTY	CKDFLKALNA	PFSYNLPRFK	NLSIEALFDK	NIVYEQADLK	1020
KE						1022

20

(配列番号 112)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0176】

CasRX/Cas13dタンパク質の例示的なダイレクトリピート配列は、配列CasRX/Cas13d_160582958_gene49834(配列番号112)を含み得るまたはそれからなり得、これは、核酸配列：CasRX/Cas13d_DR:

【化69】

gaactacacc cctctgttct tgtaggggtc taacac

36

(配列番号 113)

30

を含むまたはそれからなる。

【0177】

例示的なCasRX/Cas13dタンパク質は、配列：

CasRX/Cas13d_250twins_35838_GL0110300:

【化70】

MGNKQRVSAQ	KRRENAKLCN	QQKARQAESQ	RDKIKNMNVE	KMKNINTNDI	KHTKTAKKL	60
GLKSTIIADK	KIILTSFINE	QSSKTANIEK	VAGFKGDTID	TISYTPRMFR	SEINPGEIVI	120
SKGDDLSEFA	NPANFPIGRD	YVKIRSALEK	QYFGKEFPED	NLHVQIAYNV	ADIKKILSVY	180
INNIIYMFYN	LARSEEYDIF	YNSQSENSGR	DCDVIGSLYY	QASYRNQDAN	RFEKDGKKKA	240
IDSLDDTRA	YYTYFDGLFS	VPKREDDGKI	KESEKEKAKD	QNFDVLRLLS	VGRQLTFHSD	300
KSNNEAYLFD	LSKLTRAAQD	ENRRQDIQSL	LNILNSTCRS	NLEGVNGDFV	KHAKNNLYVL	360
NQLYPSLKAN	DLIGEYYNFI	VKKENRNIGI	RLITVRELII	EHNITNLKDS	KYDTYRNKIY	420
TVLNFILFRE	IQENSIKAIK	FREKLRSTEK	AEQPALYQAF	ANKIYPMVQA	KFAKAIDLFE	480
EQYKTKFKSE	FKGGISIENM	QQQNILLQTE	NIDYFSKYVL	FLTQKFLDGKE	INELLCALIN	540
KFDNIADLLD	ISKQIGTPVV	FCADYESLND	AAKIAENIRL	IKNIAHLRPA	IQEAQSSKDN	600
ADAAGTPATL	LIDAYNMLNT	DIQLVYGEAA	YEELRKDLFE	RKNGTKYNKK	GKKVDVYDHK	660
FRNFLINVI	KSKWFFYIAK	YVKPADCAKM	MSNKKMIEFA	LRDLPETQIK	RYYTITGNE	720
ALGDAESLKG	VIIIEQLHAFS	IKNTLLSIKN	MGEGEYKIQQ	IGSSKEKLLA	IVNLYLTVAY	780
LLTKSLVKVN	IRFSIAFGCL	ERDLVLQKKS	EKKFDAIINE	ILLEDDKIRK	ECDKERAQAK	840
TLPRELAQER	FAQIKRRESG	CYFKSYHVYD	YLSKNSNEFK	QNHIDFAVTS	YRNNVEHLNV	900
VHCMTKYFSE	VKDVKSYGV	YCYIMQRLC	DELIKNQDK	PDVRQTFEY	NRLKDHGTY	960
SKNLMWLLNF	PFAYNLARYK	NLSNEDLFNA	KNNDQKSK			998

10

(配列番号 114)

20

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0178】

例示的な CasRX / Cas13d タンパク質は、配列：

CasRX / Cas13d 250twins__36050__GL0158985 :

【化71-1】

MKKKHQSAAE	KRQVKLKNQ	EKAQKYASEP	SPLQSDTAGV	ECSQKKTVVS	HIASSKTLAK	60
AMGLKSTLVM	GDKLVITSEA	ASKAVGGAGY	KSANIEKITD	LQGRVIEEHE	RMFSADVGEK	120

【化71-2】

NIELSKNDCH	TNVNNPVVTN	IGKDYIGLKS	RLEQEFGKT	FENDNLHVQL	AYNILDIKKI	180
LGTYYNNIY	IFYNLNPRAGT	GRDERMYDDL	IGTLYAYKPM	EAQQTYLLKG	DKDMRRFEEV	240
KQLLQNTSAY	YVYGYTLFEK	VKAKSKKEQR	AKEAEIDACT	AHNYDVLRL	SLMRQLCMHS	300
VAGTAFKLAE	SALFNIEDVL	SADLKEILDE	AFSGAVNKLN	DGFVQHSQNN	LYVLQQLYPN	360
ETIERIAEKY	YRLTVRKEDL	NMGVNIKKLR	ELIVGQYFPE	VLDKEYDLSK	NGDSVVTYRS	420
KIYTVMNYYL	LYYLEDHDSS	RESMVEALRQ	NREGDEGKEE	IYRQFAKKVW	NGVSGLFGVC	480
LNLFKTEKRN	KFRSKVALPD	VSGAAYMLSS	ENIDYFVKML	FFVCKFLDGG	EINELLCALI	540
NKFDNIADIL	DAAAQCGSSV	WFVDSYRFFE	RSRRISAQIR	IVKNIASKDF	KSKKSDDES	600
YPEQLYLDAL	ALLGDVISKY	KQNRDGSVVI	DDQGNVLTTE	QYKRFRYEFF	EEIKRDESGG	660
IKYKSKGKPE	YNHQRNFIL	NNVLKSKWFF	YVVKYNRPSS	CRELMKNKEI	LRFVLRDIPD	720
SQVRRYFKAV	QGEEAYASAE	AMRTRLVDAL	SQFSVTAQLD	EVGGMTDKEF	ASQRAVDSKE	780
KLRAIIRLYL	TVAYLITKSM	VKVNTRFSIA	FSVLERDYLL	LIDGKKKSSD	YTGEDMLALT	840
RKFVGEDAGL	YREWKEKNAE	AKDKYFDKAE	RKKVLRQNDK	MIRKMHFTPH	SLNYVQKNLE	900
SVQSNGLAAV	IKEYRNAVAH	LNIINRLDEY	IGSARADSY	SLYCYCLQMY	LSKNFVSGYL	960
INVQKQLEEH	HTYMKDLMWL	LNIPFAYNLA	RYKNLSNEKL	FYDEEAAAEK	ADKAENERGE	1020

30

40

(配列番号 115)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0179】

Yan et al.(2018) Mol Cell. 70 (2): 327-339 (doi:10.1016/j.molcel.2018.02.2018) および Konermann et al.(2018) Cell 173 (3): 665-676 (doi:10.1016/j.cell.2018.02.033) には、CasRX / Cas13d タンパク質について記載されており、

50

これらはどちらもその全体が参照により本明細書に組み込まれる。その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO公開第WO2018/183703号(CasM)および同第WO2019/006471号(Cas13d)も参照されたい。

【0180】

本開示の例示的な野生型Cas13dタンパク質は、アミノ酸配列：

【0181】

Cas13d (Ruminococcus flavefaciens XPD3002) 配列：

【化72】

1	IEKKKSFAGK	MGVKSTLVSG	SKVYMTTFAE	GSDARLEKIV	EGDSIRSVNE	GEAFSAEMAD	10
61	KNAGYKIGNA	KFSHPKGYAV	VANNPLYTGP	VQQDMLGLKE	TLEKRYFGES	ADGNDNICIQ	
121	VIHNILDIEK	ILAEYITNAA	YAVNNISGLD	KDIIGFGKFS	TVYTYDEFKD	PEHHRAAFNN	
181	NDKLINAIKA	QYDEFDNFLD	NPRLGYFGQA	FFSKEGRNYI	INYGNECYDI	LALLSGLAHW	
241	VVANNEEESR	ISRTWLYNLD	KNLDNEYIST	LNLYLYDRITN	ELTNSFSKNS	AANVNYIAET	
301	LGINPAEFAE	QYFRFSIMKE	QKNLGFNITK	LREVMLDRKD	MSEIRKNHKV	FDSIRTKVYT	
361	MMDFVIYRYY	IEEDAKVAAA	NKSLPDNEKS	LSEKDIFVIN	LRGSFNDDQK	DALYYDEANR	
421	IWRKLENIMH	NIKEFRGNKT	REYKKKDAPR	LPRILPAGRD	VSAFSKLMYA	LTMFLDGKEI	
481	NDLLTTLINK	FDNIQSFLKV	MPLIGVNAKF	VEEYAFFKDS	AKIADELRLI	KSFARMGEPI	
541	ADARRAMYID	AIRILGTNLS	YDELKALADT	FSLDENGNKL	KKGKHGMRNF	IINNVISNKR	
601	FHYLIRYGDP	AHLHEIAKNE	AVVKFVLGRI	ADIQKKQGQN	GKNQIDRYYE	TCIGKDKGKS	
661	VSEKVDALTK	IITGMNYDQF	DKKRSVIEDT	GRENAEREKF	KKIISLYLTV	IYHILKNIVN	
721	INARYVIGFH	CVERDAQLYK	EKGYDINLKK	LEEKGFSSVT	KLCAGIDETA	PDKRKDVEKE	
781	MAERAKESID	SLESANPKLY	ANYIKYSDEK	KAEEFTRQIN	REKAKTALNA	YLRNTKWNVI	20
841	IREDLLRIDN	KTCTLFANKA	VALEVARYVH	AYINDIAEVN	SYFQLYHYIM	QRIIMNERYE	
901	KSSGKVSEYF	DAVNDEKKYN	DRLLKLLCVP	FGYCIPRFKN	LSIEALFDRN	EAAKFDKEKK	
961	KVSGNS (配列番号	45)				

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0182】

本開示の例示的な野生型Cas13dタンパク質は、アミノ酸配列：

【0183】

Cas13d (コンティゲ e - k 8 7 _ 1 1 0 9 2 7 3 6) :

【化 7 3】

MKRQKTFAKRIGIKSTVAYGQGYAITTFGKGSKAEIAVRSADPPEETLPTESDATLSIHAKFA
 KAGRDGREFKCGDVDETRIHTSRSEYESLISNPAESPREDYLGLKGTLEKFFFGDEYPKDNLRI
 QIIYSILDIQKILGLYVEDILHFVDGLQDEPEDLVGLGLGDEKMQKLLSKALPYMGFFGSTDVF
 KVTKKREERAAADEHNAKVFRALGAI RQKLAHF KWKESLAI FGANANMP I RFFQ GATGGRQLWN
 DVIAPLWKKRIERVRKSFLSNSAKNLWVLYQVFKDDTDEK K K A R A R Q Y Y H F S V L K E G K N L G F N L
 TKTREYFLDKFFPIFHSSAPDVKRKVDTFRSKFYAILDFIIYEASVSVANSQMGKVAPWKGAI
 DNALVKLREAPDEEAKEKIYNVLAASIRNDSLFLRLKSACDKFGAEQNRPVFPNELRNNRDIRN
 VRSEWLEATQDVAADFVQLIAFLCNFLEGKEINELVTALIKKFEQALIDLRLNLEGVDSIR
 FENEFALFNDDKGNMAGRIARQLRLLASVVGKMKPDMTDAKRVLKSALEILGAPPDEVSEWLA
 ENILLDKSNNDYQKAKKTVNPFERNYIAKNVITSRSFYLLVRYAKPTAVRKLMSNPKIVRYVLKR
 LPEKQVASYYSAIWTQSESNSNEMVKLIEMIDRLTTEIAGFSFAVLKDKKDSIVSASRESRAVN
 LEVERLKKLTTLYMSIAYIAVKS LVKNARYFIAYSALERDLYFFNEKYGEEFRLHFIPYELNG
 KTCQFEYLAILKYLLARDEETLKRKCEICEEIKVGCEKHKKNNANPPYEYDQEWIDKKKALNSER
 KACERRLHFSTHWAQYATKRDENMAKHPQKWYDILASHYDELLALQATGWLATQARNDAEHLNP
 VNEFDVYIEDLRRYPEGTPKNKDYHIGSYFEIYHYIRQRAYLEEVLAKRKEYRDSGSFTDEQLD
 KLQKILDDIRARGSYDKNLLKLEYLPFAYNLPRYKNLTTEALFDDDSVSGKKRVAEWRERETR
 EAEREQRRQR (配列番号 46)

10

20

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0184】

C a s 1 3 d の例示的なダイレクトリピート配列 (コンティグ e - k 8 7 _ 1 1 0 9 2
 7 3 6) (配列番号 4 6) は、核酸配列 : C a s 1 3 d (コンティグ e - k 8 7 _ 1 1 0
 9 2 7 3 6) ダイレクトリピート配列) : G T G A G A A G T C T C C T T A T G G G G
 A G A T G C T A C (配列番号 4 7) を含むまたはそれからなる。

30

【0185】

本開示の例示的な野生型 C a s 1 3 d タンパク質は、アミノ酸配列 :

【0186】

C a s 1 3 d (1 6 0 5 8 2 9 5 8 _ g e n e 4 9 8 3 4) :

【化 7 4 - 1】

MKNSVTFKLIQAQENKEAARKKAKDIAEQARIAKRNGVVKKEENRINRIQIEIQTKKSNTQNA
 YHLKSLAKAAGVKS VFAIGNDLLMTGFGPGNDATIEKRVFQNRAIETLSSPEQYSAEFQNKQFK
 IKGNIKVLNHSTQKMEEIQTELQDNYNRPHFDLLGCKNVLEQKYFGRTFSDNIHVQIAYNIMDI
 EKLLTPYINNI IYTLNELMRDNSKDDFFGCDSHFSVAYLYDELKAGYSDRLKT KPNLSKNIDRI

40

【化74-2】

WNNFCNYMNSDSGNTEARLAYFGELFYKPKETGDAKSDYKTHLSNNQKEEWELKSDKEVYNI FA
 ILCDLRHFCTHGESITPSGKPFYPYNLEKNLFPEAKQVLNSLFEEKAESLGAEAFGKTAGKTDVS
 ILLKVFEKEQASQKEQQALLKEYYDFKVQKTYKNMGFSIKKLREAIMEIPDAAKFKDDLYSSLR
 HKLYGLFDFILVKHFLDTSSENLOQNDIFRQLRACRCEEEKDQVYRSIAVKVWEKVKKKELNM
 FKQVVVIPSLSKDELKQMEMTKNTELLSSIETISTQASLFSEMIEMMTYLLDGKEINLLCTSLI
 EKFNIASFNEVLKSPQIGYETKYTEGYAFFKNADKTAKELRQVNNMARMTKPLGGVNTKCVMY
 NEAAKILGAKPMSKAELESVFNLNDHDTYSPSGKKIPNKNFRNFIINNVTISRFLYLIRYGN
 PEKIRKIAINPSIISFVLKQIPDEQIKRYYPCCIGKRTDDVTLMRDELGKMLQSVNFEQFSRVN
 NKQNAKQNPNGEKARLQACVRLYLTVPYLFIKMMVNINARYVLAHFHCLERDHALCFNSRKLND
 SYNEMANKFQMRKAKKEQYEKEYKCKKQETGTAHTKKIEKLNQQIAYIDKDIKNMHSYTCRNY
 RNLVAHLNVVSKLQNYVSELPNDYQITSYFSFYHYCMQLGLMEKVSSKNIPLVESLKNEANDAQ
 SYSAKKTLEYFDLIEKNRTYCKDFLKALNAPFSYNLPRFKNLSIEALFDKNIVYEQADLKKE

10

(配列番号 48)

を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0187】

Cas13dの例示的なダイレクトリピート配列(160582958__gene49834)(配列番号48)は、核酸配列:

【0188】

Cas13d(160582958__gene49834)ダイレクトリピート配列:

【化75】

GAACTACACCCCTCTGTTCTTGTAGGGGTCTAACAC (配列番号 49)

を含むまたはそれからなる。

【0189】

本開示の例示的な野生型Cas13dタンパク質は、アミノ酸配列:

30

【0190】

Cas13d(コンティグtpg|DJXD01000002.1|;培養されていないRuminococcusアセンブリ、UBA7013、ヒツジ腸内メタゲノム由来):

【化76-1】

MKKQKSKKTVSKTSGLKEALSVQGTVIMTSFGKGNMANLSYKIPSSQKPQNLNSSAGLKNVEVS
 GKKIKFQGRHPKIATTDNPLFKPQPGMDLLCLKDKLEMHYFGKTFDDNIHIQLIYQILDIEKIL
 AVHVNNIVFTLDNVLHPQKEELTEDFIGAGGWRINLDYQTLRGQTNKYDRFKNYIKRKELLYFG
 EAFYHENERRYEEDIFAILTLLSALRQFCFHSDLSSDES DHVNSFWLYQLEDQLSDEFKETLSI
 LWEEVTERIDSEFLKTNVNLHILCHVFPKESKETIVRAYYEFLIKKSFKNMGFSIKKLREIML
 EQSDLKSFKEDKYNSVRKLYKLFDFIITYYYDHHAFFEKEALVSSLRSSLTEENKEEIIYIKTAR
 TLASALGADFKKAAADVNAKNIRDYQKKANDYRISFEDIKIGNTGIGYFSELIYMLTLLLDGKE
 INDLLTTLINKFDNIISFIDILKKNLLEFKFKPEYADFFNMTNCRYTLEELRVINSIARMQKPS
 ADARKIMYRDALRILGMDNRPDEEIDRELERTMPVGADGKFIKKGQGFRNFIASNVIESSRFHY

40

【化76-2】

LVRYNNPHKTRTLVKNPNVVKFVLEGIPETQIKRYFDVCKGQEIPPTSDKSAQIDVLARIISSV
DYKIFEDVQPQSAKINKDDPSRNFSDALKKQRYQAIIVSLYLTVMYLITKNLVVNSRYVIAFHCL
ERDAFLHGVTLPKMNKKIVYSQLTTHLLTDKNYTTYGHLKNQKGRKQWYVVLVKNLQNSDITAV
SSFRNIVAHISVVRNSNEYISGIGELHSYFELYHYLVQSMIAKNNWYDTSHQPKTAEYLNLLKK
HHTYCKDFVKAYCIPFGYVVPYKNTLINELFDRNNPNPEPKEEV (配列番号 50)

を含み得るまたはそれからなり得る。

【0191】

10

Cas13dの例示的なダイレクトリピート配列(コンティグtpg|DJXD01000002.1|;培養されていないRuminococcusアセンブリ、UBA7013、ヒツジ腸内メタゲノム由来)(配列番号50)は、核酸配列:Cas13d(コンティグtpg|DJXD01000002.1|;培養されていないRuminococcusアセンブリ、UBA7013、ヒツジ腸内メタゲノム由来)ダイレクトリピート配列:

【化77】

CAACTACAACCCCGTAAAAATACGGGGTCTGAAAC (配列番号 51)

を含むまたはそれからなる。

gRNA標的配列

20

【0192】

本開示の組成物の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、第1のRNA結合性タンパク質および/または第2のRNA結合性タンパク質に対応する配列モチーフを含む。

【0193】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、配列モチーフは、疾患または障害のシグネチャーである。

【0194】

本開示の配列モチーフは、ゲノム配列内に見いだされる外来または外因性配列の配列から単離し得るまたはそれに由来し得、したがって、本開示のmRNA分子または本開示のRNA配列内に見いだされる外来または外因性配列の配列に翻訳される。

30

【0195】

本開示の配列モチーフは、疾患または障害を引き起こす、内因性配列内の変異を含み得るまたはそれからなり得る。変異は、配列の置換、逆位、欠失、挿入、転位、またはこれらの任意の組合せを含み得るまたはそれからなり得る。

【0196】

本開示の配列モチーフは、リピート配列を含み得るまたはそれからなり得る。一部の実施形態では、リピート配列は、マイクロサテライト不安定性(MSI)に関連し得る。1つまたは複数の遺伝子座におけるMSIは、本開示の細胞のDNAミスマッチ修復機構が損なわれたことに起因する。DNAの超可変配列は、超可変配列を含むまたはそれからなる標的配列を含む本開示のmRNAに転写され得る。

40

【0197】

本開示の配列モチーフは、バイオマーカーを含み得るまたはそれからなり得る。バイオマーカーは、疾患または障害が発生するリスクを示すものであり得る。バイオマーカーは、健康な遺伝子(疾患または障害が発生することの確定可能なリスクが低いまたはリスクがない)を示すものであり得る。バイオマーカーは、編集された遺伝子を示すものであり得る。例示的なバイオマーカーとしては、これだけに限定されないが、一塩基多型(SNP)、配列バリエーションまたは変異、エピジェネティックマーク、スプライスアクセプター部位、外因性配列、異種配列、およびこれらの任意の組合せが挙げられる。

【0198】

50

本開示の配列モチーフは、二次構造、三次構造または四次構造を含み得るまたはそれからなり得る。二次構造、三次構造または四次構造は、内因性または天然に存在するものであり得る。二次構造、三次構造または四次構造は、誘導されたまたは天然に存在しないものであり得る。二次構造、三次構造または四次構造は、内因性配列、外因性配列、または異種配列にコードされるものであり得る。

【0199】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、終点を含めて、2個から100個の間のヌクレオチドまたは核酸塩基を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、終点を含めて、2個から50個の間のヌクレオチドまたは核酸塩基を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、終点を含めて、2個から20個の間のヌクレオチドまたは核酸塩基を含むまたはそれからなる。

10

【0200】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は連続している。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は連続していない。例えば、RNA分子の標的配列は、標的配列のヌクレオチド間に1つまたは複数の断続的なヌクレオチドが位置することに起因して連続していない1つまたは複数のヌクレオチドまたは核酸塩基を含み得るまたはそれからなり得る。

【0201】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、天然に存在するものである。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、天然に存在しないものである。例示的な天然に存在しない標的配列は、配列バリエーションもしくは変異、キメラ配列、外因性配列、異種配列、キメラ配列、組換え配列、改変もしくは合成されたヌクレオチドを含む配列またはこれらの任意の組合せを含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0202】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、本開示のガイドRNAに結合する。

【0203】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、本開示の第1のRNA結合性タンパク質に結合する。

30

【0204】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、本開示の第2のRNA結合性タンパク質に結合する。

RNA分子

【0205】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、標的配列を含む。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、少なくとも1つの標的配列を含む。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、1つまたは複数の標的配列を含む。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、2つまたはそれよりも多くの標的配列を含む。

【0206】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、天然に存在するRNA分子である。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、天然に存在しない分子である。例示的な天然に存在しないRNA分子は、配列のバリエーションまたは変異、キメラ配列、外因性配列、異種配列、キメラ配列、組換え配列、改変または合成されたヌクレオチドを含む配列またはこれらの任意の組合せを含み得るまたはそれからなり得る。

40

【0207】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、ウイルスから単離されたまたはそれに由来する配列を含むまたはそれからなる。

【0208】

50

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、原核生物から単離されたまたはそれに由来する配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、古細菌の種もしくは株または細菌の種もしくは株から単離されたまたはそれに由来する配列を含むまたはそれからなる。

【0209】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、真核生物から単離されたまたはそれに由来する配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、原生動物、寄生生物、原生生物、藻類、真菌、酵母、アメーバ、蠕虫、微生物、無脊椎動物、脊椎動物、昆虫、齧歯類、マウス、ラット、哺乳動物、または霊長類の種から単離されたまたはそれに由来する配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、ヒトから単離されたまたはそれに由来する配列を含むまたはそれからなる。

10

【0210】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、生物体またはウイルスゲノム由来のコード配列に由来する配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、一次RNA転写物、メッセンジャーRNA前駆体(プレmRNA)またはメッセンジャーRNA(mRNA)を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、プロセシングされていない遺伝子産物(例えば、転写物)を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、転写後プロセシングを受けた遺伝子産物(例えば、5'キャップおよび3'ポリアデニル化シグナルを含む転写物)を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、選択的スプライシングを受けた遺伝子産物(例えば、スプライスバリエント)を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、非コード配列および/またはイントロン配列の除去を受けた遺伝子産物(例えば、メッセンジャーRNA(mRNA))を含むまたはそれからなる。

20

【0211】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、非コード配列(例えば、非コードRNA(ncRNA))に由来する配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、リボソームRNAを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、小さなncRNA分子を含むまたはそれからなる。本開示の例示的なスモールRNA分子としては、これだけに限定されないが、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉(siRNA)、piwi相互作用RNA(piRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、細胞外またはエキソソームRNA(exRNA)、および低分子カハール体特異的RNA(scRNA)が挙げられる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、長いncRNA分子を含むまたはそれからなる。本開示の例示的な長いRNA分子としては、これだけに限定されないが、X-不活性特異的転写物(Xist)およびHOX転写物アンチセンスRNA(HOTAIR)が挙げられる。

30

【0212】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物を細胞内空間内で接触させる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物を細胞質ゾル空間内で接触させる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物を核内で接触させる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物を小胞、細胞の膜に結合した区画、または細胞小器官において接触させる。

40

【0213】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物を細胞外空間内で接触させる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物をエキソソーム内で接触させる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物をリボソーム、ポリマーソーム、ミセルまたはナノ粒子内で接触させる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物を細胞外マトリックス内で接触させ

50

る。一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物を液滴中で接触させる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子と本開示の組成物をマイクロ流体液滴中で接触させる。

【0214】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、一本鎖配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のRNA分子は、二本鎖配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、二本鎖配列は、2つのRNA分子を含む。一部の実施形態では、二本鎖配列は、RNA分子1つとDNA分子1つを含む。二本鎖配列がRNA分子1つとDNA分子1つを含む場合を含めた一部の実施形態では、本開示の組成物は、RNA分子に選択的に結合し、必要に応じて、それを選択的に切る。

10

RNA結合性エンドヌクレアーゼ

【0215】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAと会合する様式でRNAに結合する。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAを切断する(cleave)様式でRNAと会合する。

【0216】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAseを含むまたはそれからなる。

【0217】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAse1を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse1タンパク質は、

20

【化78】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGLCKPVNTFVHEPLVDVQNV
CFQEKVTCKNGQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSPYV
PVHFDASVEDST (配列番号 20)

を含むまたはそれからなる。

【0218】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAse4を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse4タンパク質は、

30

【化79】

QDGMYQRFLRQHVHPEETGGSDRYCDLMMQRRKMTLYHCKRFNTFIHEDIWNIRSICS
TTNIQCKNGKMNCHEGVVKVTDCRDTGSSRAPNCRYRAIASTRRVVIACEGNPQVPVH
FDG (配列番号 21)

を含むまたはそれからなる。

【0219】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAse6を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse6タンパク質は、

40

【化80】

WPKRLTKAHWFEIQHIQPSPLQCNRAMSGINNYTQHCKHQNTFLHDSFQNVAAVCDLL
SIVCKNRRHNCHQSSKPVNMTDCRLTSGKYPQCRYSAQAQYKFFIVACDPPQKSDPPYK
LVPVHLDL (配列番号 22)

を含むまたはそれからなる。

【0220】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAse7を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse7タンパク質は、

50

【化 8 1】

APARAGFCPLLLLLLLGLWVAEIPVSAKPKGMTSSQWFKIQHMQPSPQACNSAMKNINK
HTKRCKDLNTFLHEPFSSVAATCQTPKIACKNGDKNCHQSHGPPVSLTMCKLTSGKYPC
RYKEKRQNKSYVVACKPPQKKDSQQFHLVPVHLDRL (配列番号 23)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 2 1】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNA se 8 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA se 8 タンパク質は、

【化 8 2】

TSSQWFKTQHVQPSPQACNSAMSIINKYTERCKDLNTFLHEPFSSVAITCQTPNIACKNSC
KNCHQSHGPPMSLTMGELTSGKYPCRYKEKHLNTPYIVACDPPQQGDPGYPLVPVHLD
KVV (配列番号 24)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 2 2】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNA se 2 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA se 2 タンパク質は、

【化 8 3】

KPPQFTWAQWFETQHINMTSQQCTNAMQVINNYQRRCKNQNTFLLTTFANVVNVCGN
PNMTCPSNKTRKNCHHSGSQVPLIHCNLTTPSPQNISNCRYAQTPANMFYIVACDNRDQ
RRDPPQYPVVPVHLDRII (配列番号 25)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 2 3】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNA se 6 PL を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA se 6 PL タンパク質は、

【化 8 4】

DKRLRDNHEWKKLIMVQHPETVCEKIQNDCRDPDYWTIHGLWPKSEGCNRSWPF
NLEEIKKNWMEITDSSLPSPMGPAPPRWMRSTPRRSTLAEAWNSTGSWTSTGGCALPP
AALPSGDLCCRPSLTAGSRGVGVDLTALHQLLHVHYSATGIPEECSEPTKPFQIILHHDH
TEWVQSIGMPIWGTISSSESAIGKNEESQPACAVLSHDS (配列番号 26)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 2 4】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、RNA se L を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA se L タンパク質は、

10

20

30

【化 8 5】

AAVEDNHLLIKAVQNEVDLVQQLEGGANVNFQEEEGGWTPHNAVQMSREDIVEL
 LLRHGADPVLRRKNGATPFILAAIAGSVKdLLKLFLSKGADVNECDFYGFATFMEAAVY
 GKVKALKFLYKRGANVNLRRKTKEDQERLRKGGATALMDAAEKGHVEVLKILLDEM
 GADVNAACDNMGRNALIHALLSSDDSDVEAITHLLLDHGADVNVRRGERGKTPLILAVEK
 KHLGLVQRLLEQEHIEINDTSDGKTALLLAVELKLKKAELLCKRGASTDCGDLVMTA
 RRYNDHSLVKVLLSHGAKEDFHPPAEDWKPQSSHWGAALKDLHRIYRPMIGKLFKFFID
 EKYKIADTSEGGIYLGfyEKQEVAVKTFCEGSPRAQREVSCLQSSRENSHLVTFYGSESH
 RGHLFVCVTLCEQTLEACL DVHRGEDVENEDEFARNVLSSIFKAVQELHLSCGYTHQD
 LQPQNILIDSKKAAHLADFDKSIKWAGDPQEVKRDLEDLGRVLVYVVKKGSISFEDLKA
 QSNEEVVQLSPDEETKDLIHRLFHPGEHVRDCLSDLLGHPFFWTWESRYRTLNRVGNES
 DIKTRKSESEILRLLQPGPSEHSKSFDKWTTKINECVMMKMNKFYEKRGNFYQNTVGD
 LKFIRNLGEHIDEKHKMKLKIGDPSLYFQKTFPDLVIYVYTKLQNTYRKHFPQTHSP
 NKPQCDGAGGASGLASPGC (配列番号 27)

10

20

を含むまたはそれからなる。

【0 2 2 5】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAse T2を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse T2タンパク質は、

【化 8 6】

VQHWPETVCEKIQNDCRDPPDYWTIHGLWPKSEGCNRSWPFNLEEIKDLLPEMRAIW
 PDVIHSFPNRSRFWKHEWEKHGTCAAQVDALNSQKKYFGRSLELYRELDLNSVLLKLG
 KPSINYYQVADFKDALARVYGVIPKIQLPPSQDEEVQTIGQIELCLTKQDQQLQNC
 TEPGEQPSPKQEVWLANGAAESRGLRVCEGDPVFYPPPKTKH (配列番号 28)

30

を含むまたはそれからなる。

【0 2 2 6】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAse 11を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse 11タンパク質は、

【化 8 7 - 1】

EASESTMKIIKEEFTDEEMQYDMAKSGQEKQTIEILMNPILLVKNTSLSMSKDDMSSTLL

【化 8 7 - 2】

TFRSLHYNDPKGNSSGNDKECCNDMTVWRKVSEANGSCKWSNNFIRSSTEVMRRVHR
 APSCKFVQNPGISCCESLELENTVCQFTTGKQFPRCQYHSVTSLEKILTVLTGHSLMSWL
 VCGSKL (配列番号 29)

40

を含むまたはそれからなる。

【0 2 2 7】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAse T2様を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNAse T2様タンパク質は、

【化 8 8】

XLGGADKRLRDNHEWKKLIMVQHWPETVCEKIQNDCRDPDPDYWTIHGLWPKSEGCN
 RSWPFNLEEIKDLLPEMRAYWPDVIHSFPNRSRFWKHEWEKHGTCAAQVDALNSQKKY
 FGRSLELYRELDLNSVLLKLGKPSINYQTTEEDLNLDVEPTTEDTAAEVTIHVLLHSAL
 FGEIGPRRW (配列番号 30)

を含むまたはそれからなる。

【0 2 2 8】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 R N A s e を含むまたはそれからなる。

【0 2 2 9】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R n a s e 1 (K 4 1 R) ポリペプチドは、

【化 8 9】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCPVNTFVHEPLVDVQNV
 CFQEKVTCKNGQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIVACEGSPYV
 PVHFDASVEDST (配列番号 116)

を含むまたはそれからなる。

【0 2 3 0】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R 、 D 1 2 1 E)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R 、 D 1 2 1 E)) ポリペプチドは、

【化 9 0】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCPVNTFVHEPLVDVQNV
 CFQEKVTCKNGQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIVACEGSPYV
 PVHFEASVEDST (配列番号 117)

を含むまたはそれからなる。

【0 2 3 1】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R 、 D 1 2 1 E 、 H 1 1 9 N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R 、 D 1 2 1 E 、 H 1 1 9 N)) ポリペプチドは、

【化 9 1】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCPVNTFVHEPLVDVQNV
 CFQEKVTCKNGQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIVACEGSPYV
 PVNFEASVEDST (配列番号 118)

を含むまたはそれからなる。

【0 2 3 2】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 R n a s e 1 を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (H 1 1 9 N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R n a s e 1 (R n a s e 1 (H 1 1 9 N)) ポリペプチドは、

10

20

30

40

【化92】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNV
CFQEKVTCKNGQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCA YRTSPKERHII VACEGSPYV
PVNFDASVEDST (配列番号 119)

を含むまたはそれからなる。

【0233】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型Rnase1 (Rnase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N))ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase1 (Rnase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N))ポリペプチドは、

10

【化93】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGDCKPVNTFVHEPLVDVQNV
CFQEKVTCKDGQGNCYKSNSSMHITDCRLTADSDYPNCA YRTSPKERHII VACEGSPYV
PVNFDASVEDST (配列番号 120)

を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型Rnase1 (Rnase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N))ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase1 (Rnase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N、K41R、D121E))ポリペプチドは、

20

【化94】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGDCRPVNTFVHEPLVDVQNV
CFQEKVTCKDGQGNCYKSNSSMHITDCRLTADSDYPNCA YRTSPKERHII VACEGSPYV
PVNFEASVEDST (配列番号 121)

を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型Rnase1 (Rnase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N))ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Rnase1 (Rnase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D))ポリペプチドは、

30

【化95】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGDCKPVNTFVHEPLVDVQNV
CFQEKVTCKDGQGNCYKSNSSMHITDCRLTADSDYPNCA YRTSPKERHII VACEGSPYV
PVHFDASVEDST (配列番号 122)

を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、

【化96】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGDCRPVNTFVHEPLVDVQNV
CFQEKVTCKDGQGNCYKSNSSMHITDCRLTADSDYPNCA YRTSPKERHII VACEGSPYV
PVNFEASVEDST (配列番号 208)

40

を含むまたはそれからなる変異型Rnase1 (Rnase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N、K41R、D121E))ポリペプチドを含むまたはそれからなる。

【0234】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、NOB1ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、NOB1ポリペプチドは、

50

【化 9 7】

APVEHVADAGAFRLRHAALQDIGKNIYTIREVVTEIRDKATRRRLAVLPYELRFKEPLPE
 YVRLVTEFSKKTGDYPSLSATDIQVLALTYQLEAEFVGVSHLKQEPQKVKVSSSIQHPET
 PLHISGFHLPYKPKPPQETEKGHSACEPENLEFSSFMFWRNPLPNIDHELQELLIDRGEDV
 PSEEEEEENGFEEDRKDDSDDDGGGWITPSNIKQIQELEGCDVPEDVRVGCLTTDFAM
 QNVLLQMGLHVLAVNGMLIREARSYL RCHGCFKTTSDMSRVFCSHCGNKTLKKVSVT
 V (配列番号 31)

10

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 3 5】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼ V (E N D O V) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、E N D O V タンパク質は、

【化 9 8】

AFSGLQRVGGVDVSVFKGDSVRACASLVVLSFPELEVVEESRMVSLTAPYVSGFLAFR
 EVPFLELVQQLREKEPGLMPQVLLVDGNGVLHHRGFGVACHLGVLTDLPCVGVAKKL
 LQVDGLENNALHKEKIRLLQTRGDSFPLLGDSTVLGMALRSHDRSTRPLYISVGHMS
 LEAAVRLTCCCCRFRIPEPVRQADICSREHIRKS (配列番号 32)

20

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 3 6】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼ G (E N D O G) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、E N D O G タンパク質は、

【化 9 9】

AELPPVPGGPRGPGELAKYGLPGLAQLKSRESYVLCYDPRTRGALWVVEQLRPERLRG
 DGDRRECDFREDDSVHAYHRATNADYRGSFGDRGHLAAAANHRWSQKAMDDTFYLS
 NVAPQVPHLNQNAWNNLEKYSRSLTRS YQN VYVCTGPLFLPRTEADGKSYVKYQVIGK
 NHVAVPTHFFKVLILEAAGGQIELRTYVMPNAPVDEAIPLERFLVPIESIERASGLLFPNI
 LARAGSLKAITAGSK (配列番号 33)

30

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 3 7】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼ D 1 (E N D O D 1) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、E N D O D 1 タンパク質は、

40

【化 1 0 0】

RLVGE E EAGFG ECDKFFYAGTPPAGLAADSHVKICQRAEGAERFATLYSTRDRIPVYSA
 FRAPRPAPGGAEQRWLVEPQIDDPNSNLEEAINAEAITSVNSLGSKQALNTDYLDSDYQ
 RGQLYPFSLSSDVQVATFTLTNSAPMTQSFQERWYVNLHSLMDRALTPQCGSGEDLYIL
 TGTVPSDYRVKDKVAVPEFVWLAACCAVPGGGWAMGFVKHTRDSDIIEDVMVKDLQ
 KLLPFNPQLFQNNCGETE QDTEKMKKILEVVNQIQDEERMVQSQKSSSPLSSTRSKRSTL
 LPPEASEGSSSFLGKLMGFIA TPFIKLFQLIYYLVVAILKNIVYFLWCVTKQVINGIESCLY
 RLG SATISYFMAIGEELVSIPWKVLKVVAKVIRALLRILCCLLKAICRVLSIPVRVLVDVA
 TFPVYTMGAIPVCKDIALGLGGTVSLLFDTAFGTLGGLFQVVFVSVCKRIGYKVTFDNSG
 EL (配列番号 34)

10

を含むまたはそれからなる。

【0 2 3 8】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、ヒトフラップエンドヌクレア
 ーゼ - 1 (h F E N 1) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、h F E N 1 ポ
 リペプチドは、

【化 1 0 1】

MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLIAVRQGGDVLQNEEGET
 TSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAG
 AEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDCKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVKAGKVYAAA
 TEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLP IQEFHLSRILQELGLNQEQFV DLCILLGSDYCE
 SIRGIGPKRAVDLIQKHK SIEEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLD PESVELK
 WSEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLLDFFKVTGSLSSAKRKE
 PEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGK (配列番号 35)

20

30

を含むまたはそれからなる。

【0 2 3 9】

一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、DNA 修復エンドヌクレア
 ーゼ X P F (E R C C 4) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、
 E R C C 4 ポリペプチドは、

【化 1 0 2】

MESGQPARRIAMAPLLEYERQLVLELLD TDGLVVCARGLGADRLLYHFLQLHCHPA CL
 VLVLNTQPAEEEYFINQLKIEGVEHLPRRVTNEITSNSRYEVYTQGGVIFATSRILVVD FL
 TDRIPSDLITGILVYRAHRIESCQEAFILRLFRQKNKRGFIKAFTDNA VAFDTGFCHVERV
 MRNLFVRKLYLWPRFHVA VNSFLEQHKPEVVEIHVSMTPTMLAIQTAILDILNACKEL
 KCHNPSLEVEDLSLENAIGKPFDKTIRHYLDPLWHQLGAKTKSLVQDLKILRTLLQYLSQ
 YDCVTFNLNLES LRATEKAFGQNSGWFLDSSTSMFINARARVYHLPDAKMSKKEKISE
 KMEIKEGEGILWG (配列番号 124)

40

を含むまたはそれからなる。

【0 2 4 0】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、エンドヌク
 レアーゼ I I I 様タンパク質 1 (N T H L) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一

50

部の実施形態では、N T H L ポリペプチドは、

【化 1 0 3】

CSPQESGMTALSARMLTRSRSLGPGAGPRGCREEPGLRRREAAAEARKSHSPVKRPRK
AQQLRVAYEGSDSEKGEAEPLKVPVWEPQDWQQQLVNIRAMRNKKDAPVDHLGTEH
CYDSSAPPKVRRYQVLLSLMLSSQTKDQVTAGAMQRLRARGLTVDSILQTDDATLGKLI
YPVGFWRSKVKYIKQTSAILQQHYGGDIPASVAELVALPGVGPKMAHLAMAVAWGTV
SGIAVDTHVHRIANRLRWTKKATKSPEETRAALEEWLPRELWHEINGLLVGFQQQTCLP
VHPRCHAQLNQAALCPAAQGL (配列番号 123)

10

を含むまたはそれからなる。

【0 2 4 1】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヒトS c h
l l a f e n 1 4 (h S L F N 1 4) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施
形態では、h S L F N 1 4 ポリペプチドは、

【化 1 0 4】

ESTHVEFKRFTTKKVIPRIKEMLPHYVSAFANTQGGYVLIGVDDKSKEVVGCKWEKVNP
DLLKKEIENCIEKLPTFHFCCEKPKVNFTTKILNVYQKDVLDGYVCVIQVEPFCCVVF
AE
APDSWIMKDNSVTRLTAEQWVVMMLDTQSAPPSLVTDYNSCLISSASSARKSPGYPIKV
HKFKEALQ (配列番号 36)

20

を含むまたはそれからなる。

【0 2 4 2】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヒトベータ
- ラクタマーゼ様タンパク質2 (h L A C T B 2) ポリペプチドを含むまたはそれからな
る。一部の実施形態では、h L A C T B 2 ポリペプチドは、

【化 1 0 5】

TLQGTNTYL VGTGPRRILIDTGEP A I P E Y I S C L K Q A L T E F N T A I Q E I V V T H W H R D H S G G I G
D I C K S I N N D T T Y C I K K L P R N P Q R E E I I G N G E Q Q Y V Y L K D G D V I K T E G A T L R V L Y T P G H T D
D H M A L L L E E N A I F S G D C I L G E G T T V F E D L Y D Y M N S L K E L L K I K A D I I Y P G H G P V I H N A E
A K I Q Q Y I S H R N I R E Q Q I L T L F R E N F E K S F T V M E L V K I I Y K N T P E N L H E M A K H N L L L H L K K L
E K E G K I F S N T D P D K K W K A H L (配列番号 37)

30

を含むまたはそれからなる。

【0 2 4 3】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、脱プリン/
脱ピリミジン (A P) エンドデオキシリボヌクレアーゼ (A P E X) ポリペプチドを含む
またはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、脱プリン/
脱ピリミジン (A P) エンドデオキシリボヌクレアーゼ (A P E X 2) ポリペプチドを
含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、A P E X 2 ポリペプチドは、

40

【化 1 0 6 - 1】

MLRVVSWNINGIRRPLQGVANQEPSNCAAVAVGRILDELADIVCLQETKVTRDALTEP

【化 1 0 6 - 2】

LAIVEGYNSYFSFSRNRSGYSGVATFCKDNATPVAAEEGLSGLFATQNGDVG CYGNMD
EFTQEELRALDSEGRALLTQHKIRTWEGKEKTLTLINVYCPHADPGRPERLVFKMRFYR
LLQIRAEALLAAGSHVILGDLNTAHRPIDHWDAVNLECFEEDPGRKWMD SLLSNLGCQ
SASHVGP FIDS YRCFQPKQEGAF TCWSAVTGARHLNYGSRLDYVLGDRTLVIDTFQASF
LLPEVMGSDHCPVGAVLSVSSVPAKQCPLCTRFLPEFAGTQLKILRFLVPLEQSPVLEQ
STLQHNNQTRVQTCQNK AQVRSTRPQPSQVGS SRGQKNLKS YFQPS PSCPQASPDIELPS
LPLMSALMTPKTPEEKAVAKVVKGQAKTSEAKDEKELRTSFWKSVLAGPLRTP LCGGH
REPCVMRTVKKPGPNLGRRFYMCARPRGPPTDPSSRCNFFLWSRPS (配列番号 38)

10

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 4 4】

一部の実施形態では、A P E X 2 ポリペプチドは、

【化 1 0 7】

MLRVVSWNINGIRRPLQGVANQEPSNCAAVAVGRILDEL DADIVCLQETKVTRDALTEP
LAIVEGYNSYFSFSRNRSGYSGVATFCKDNATPVAAEEGLSGLFATQNGDVG CYGNMD
EFTQEELRALDSEGRALLTQHKIRTWEGKEKTLTLINVYCPHADPGRPERLVFKMRFYR
LLQIRAEALLAAGSHVILGDLNTAHRPIDHWDAVNLECFEEDPGRKWMD SLLSNLGCQ
SASHVGP FIDS YRCFQPKQEGAF TCWSAVTGARHLNYGSRLDYVLGDRTLVIDTFQASF
LLPEVMGSDHCPVGAVLSVSSVPAKQCPLCTRFLPEFAGTQLKILRFLVPLEQSP

20

(配列番号 39)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 4 5】

一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、脱プリンまたは脱ピリミジン
部位リアーゼ (A P E X 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態で
は、A P E X 1 ポリペプチドは、

30

【化 1 0 8】

PKRGKKGAVAEDGDEL RTEPEAKKSKTAAKKN DKEAAGEGPALYEDPPDQKTSPSGKP
ATLKICSWNV DGLRAWIKKGLDWVKEEAPDILCLQETKCS ENKLP AELQELPGLSHQ
YWSAPSDKEGYSGVGLLSRQCPLKVS YGIGDEEHDQEGRVIVA EFD SFVLVTAYVPNAG
RGLVRLE YRQRWDEAFRKFLKGLASRKPLVLCGDLNVAHEEIDL RNP KGNKKNAGFTP
QERQGF GELLQAVPLAD SFRHLYPNTPYAYTFW TYMMNARSKNVGWRLDYFLLS

40

(配列番号 125)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 4 6】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、アンジオゲ
ニン (A N G) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、A N G ポ
リペプチドは、

【化 1 0 9 - 1】

QDNSRYTHFLTQHYDAKPQGRDDRYCESIMRRRGLTSPCKDINTFIHG NKRSIKAICENK

50

【化 1 0 9 - 2】

NGNPHRENLRISKSSFQVTTCKLHGGSPWPPCQYRATAGFRNVVVACENGLPVHLDQSI
FRRP (配列番号 40)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 4 7】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、熱応答性タンパク質 1 2 (H R S P 1 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、H R S P 1 2 ポリペプチドは、

【化 1 1 0】

SSLIRR VISTAKAPGAIGPYSQAVLVDR TIYISGQIGMDPSSGQLVSGGVAEEAKQALKN
MGEILKAAGCDFTNVVKT TVLLADINDFNTVNEIYKQYFKSNFPARAAAYQVAALPKGS
RIEIEAVAIQGPLTTASL (配列番号 41)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 4 8】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、ジンクフィンガー C C C H 型含有 1 2 A (Z C 3 H 1 2 A) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Z C 3 H 1 2 A ポリペプチドは、

【化 1 1 1】

GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGNSVAMSHGNKEVFSCRGILLAVNWFLER
GHTDITV FVPSWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGGKR VVCYDDRFIV
KLAYESDGI VVSNDTYRDLQGERQE WKRFIEERLLMYSFVNDKFMPPDDPLGRHGPSLD
NFLRKKPLTLE (配列番号 42)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 4 9】

一部の実施形態では、Z C 3 H 1 2 A ポリペプチドは、

【化 1 1 2】

SGPCGEKPVLEASPTMSLWFE DSHSRQGT PRPGQELAAEEASALELQMKVDFFRKLG Y
SSTEIHSVLQKLG VQADTNTVLGELVKHGTATERERQTSPDPCPQLPLVPRGGGTPKAP
NLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGNSVAMSHGNKEVFSCRGILLAVNWFLER GHTDITV FV
PSWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGGKR VVCYDDRFIVKLAYESDGI
VVSNDTYRDLQGERQE WKRFIEERLLMYSFVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPL
TLEHRKQPCPYGRKCTYGIKCRFFHPERPSCPQRSVADEL RANALLSPPRAPSKDKNGRR
PSPSSQSSSLLTESEQCSLDGKKLGAQASPGSRQEGLTQTYAPSGRSLAPSGGSGSSFGPT
DWLPQTLDSL PYVSQDCLDSGIGSLESQMSELWGV RGGGPGEPGPPRAPYTGYS PYGSE
LPATAAFSAFGRAMGAGHFSVPADYPPAPPAPPPREYWSEPYPLPPPTSVLQEPPVQSPG
AGRSPWGRAGSLAKEQASVYTKLCGVFP PHLVEAVMGRFPQLLDPQQLAAEILSYKSQ
HPSE (配列番号 43)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 0】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、反応性中間体イミンデアミナーゼ A (R I D A) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実

10

20

30

40

50

施形態では、R I D A ポリペプチドは、

【化 1 1 3】

SSLIRR VISTAKAPGAIGPYSQAVLVDR TIYISGQIGMDPSSGQLVSGGVAEEAKQALKN
MGEILKAAGCDFTNVVKTTVLLADINDFNTVNEIYKQYFKSNFPARAAYQVAALPKGS

RIEIEAVAIQGPLTTASL (配列番号 44)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 1】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、ホスホリパーゼ D ファミリーメンバー 6 (P D L 6) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、P D L 6 ポリペプチドは、

【化 1 1 4】

EALFFPSQVTCTEALLRAPGAEL AELPEGCPCGLPHGESALSRLLRALLAARASLDLCLF
AFSSPQLGRAVQLLHQRGVVRVVTDCDYMALNGSQIGLLRKAGIQVRHDQDPGYMH
HKFAIVDKRVLITGSLNWTQAIQNNRENVLITEDDEYVRLFLEEFERIWEQFNPTKYTF
FPPKKSHGSCAPPVSRAGGRLLSWHRTCGTSSSESQT (配列番号 126)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 2】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、ミトコンドリアリボヌクレアーゼ P 触媒サブユニット (K I A A 0 3 9 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、K I A A 0 3 9 1 ポリペプチドは、

【化 1 1 5】

KARYKTLEPRGYSLLIRGLIHS DRWREALLLLEDIKK VITPSKKNYNDCIQGALLHQDVN
TAWNLYQELLGHDI VPMLETLKAFFDFGKDIKDDNYSNKLLDILSYLRNNQLYPGESFA
HSIKTW FESVPGKQWK GQFTTVRKSGQC SGCGKTIESIQLSPEEYECLKGKIMRDVIDGG
DQYRK TTPQELKRFENFIKSRPPFDVVIDGLNVAKMFPKVRESQ LLLNVVSQLAKRNLR
LLVLGRKHMLRRSSQWSRDEMEEVQKQASCF FADDISEDDPFLLYATLHSGNHCRFITR
DLMRDHKACL PDAKTQRLFFKWQQGHQLAIVNRFP GSKLTFQRILSYDTVVQTTGDSW
HIPYDEDLVERCSCEVPTKWLCLHQKT (配列番号 127)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 3】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、アルゴノート 2 (A G O 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。

本開示の組成物の一部の実施形態では、A G O 2 ポリペプチドは、

【化 1 1 6 - 1】

SVEPMFRHLKNTYAGLQLVVVILPGKTPVYAEVKRVGDTV LGMATQCVQMKNVQRTT
PQTL SNLCLKINVKLG GVNILLPQGRPPVFQQPVIFLGADVTHPPAGDGKKPSIAAVVG
SMDAHPNRYCATVRVQQHRQEIIQDLAAMVRELLIQFYKSTRFKPTRIIFYRDGVSEGF
QQVLHELLAIREACIKLEKDYQPGITFIVVQKRHHTRLFCTDKNERVGKSGNIPAGTTV
DTKITHPTEFD FYLC SHAGIQGTSRPSHYHVLWDDNRFSSDELQILTYQLCHTYVRCTRS

10

20

30

40

【化 1 1 6 - 2】

VSIPAPAYYAHLVAFRRARYHLVDKEHDSAEGSHTSGQSNRGRDHQALAKAVQVHQDTL
RTMYFA (配列番号 128)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 4】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、ミトコンドリアヌクレアーゼ EXOG (EXOG) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、EXOG ポリペプチドは、

【化 1 1 7】

QGAEGALTGKQPDGSAEKAVLEQFGFPLTGTEARCYTNHALSYDQAKRVPRWVLEHIS
KSKIMGDADRKHCKFKPDPNIPPTFSAFNEDYVSGSWSRGHMAPAGNNKFSSKAMAET
FYLSNIVPQDFDNNSGYWNRIEMYCRELTERFEDVWVVSGLTLPQTRGDGKKIVSYQV
IGEDNVAVPSHLYKVILARRSSVSTEPLALGAFVVPNEAIGFQPQLTEFQVSLQDLEKLSG
LVFFPHLDRTSDIRNICSVDTCLLDFQEFTLYLSTRKIEGARSVLRLEKIMENLKNAEIEP
DDYFMSRYEKKLEELKAKEQSGTQIRKPS (配列番号 129)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 5】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、ジンクフィンガー C C C H 型含有 1 2 D (Z C 3 H 1 2 D) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Z C 3 H 1 2 D ポリペプチドは、

【化 1 1 8】

EHPKMEFFQKLGVDREVDLRVVLGKLGEGALVNDVLQELIRTGSRPGALEHPAAPRLVP
RGSCGVPDSAQRGPGTAEEDFRTLASSLRPIVIDGSNVAMSHGNKETFSCRGIKLAVD
WFRDRGHTYIKVFPVSWRKDPPRADTPIREQHVLAELERQAVLVYTPSRKVHKGKRLVC
YDDRIVKVA YEQDGVIVSNDNYRDLQSENPEWKWFIEQRLLMFSFVNDRFMPPDDPL
GRHGPSLSNFLSRKPKPPEPSWQHCPYGGKCTYGIKCKFYHPERPHHAQLAVADELRAK
TGARPGAGAEQRPPRAPGGSAGARAAPREPF AHS LPPARGSPDLAALRGSFSRLAFSD
DLGPLGPPLPVPACSLTPRLGGPDWVSAGGRVPGPLSLPSPESQFSPGDLPPPGLQLQPR
GEHRPRDLHGDLLSPRRPPDDPWARPPRSDFPGRSVWAEPAWGDGATGGLSVYATED
DEGDARARARIALYSVFPRDQVDRVMAAFPELSDLARLILLVQRCQSAGAPLGKP

(配列番号 130)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 6】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、小胞体から核へのシグナル伝達 2 (ERN 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ERN 2 ポリペプチドは、

【化 1 1 9 - 1】

RQQQPQVVEKQQETPLAPADFAHISQDAQSLHSGASRRSQKRLQSPSKQAQPLDDPEAE
QLTVVGKISFNPKDVLGRGAGGTFVFRGQFEGRAVAVKRLRECFGLVRREVQLLQES
DRHPNVRLRYFCTERGPQFHIALELCRASLQEYVENPDLDRGGLEPEVVLQQLMSGLAH

【化 1 1 9 - 2】

LHSLHIVHRDLKPGNITGPDSQGLGRVVLSDFGGLCKKLPAGRCSFSLHSGIPGTEGWM
 APELLQLLPPDSPTS AVDIFSAGCVFYVLSGGSHPFGDSL YRQANILTGAPCLAHLEEEV
 HDKVVARDLVGAMLSPLPQPRPSAPQVLAHPFFWSRAKQLQFFQDVS DWLEKESEQEP
 LVRAL EAGGCAVVRDNWHEHISMPLQTDLRKFRSYKGT SVRDLLRAVRNKKHHYREL
 PVEVRQALGQVPDGFVQYFTNRFPRLLLHTHRMRSCASESLFLPYPPDSEARRPCPG
 ATGR (配列番号 131)

10

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 7】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ペロタmRNAサーベイランスおよびリボソームレスキュー因子(PELO)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、PELOポリペプチドは、

【化 1 2 0】

KLVRK NIEKDNAGQVTLVPEEPEDMWHTYNLVQVGDSLRASTIRKVQTESSTG SVGSN
 RVRTTLTLCVEAIDFDSQACQLRVKGTNIQENEYVKMGAYHTIELEPNRQFTLAKKQW
 DSVVLERIEQACDPAWSADVA AVVMQEGLAHICLVTPSMTLTRAKVEVNIPRKRKGN
 SQHDRALERFYEQVVQAIQRHIHFDVVKCILVASPGFVREQFCDYLFQQAVKTDNKKLL
 ENRSKFLQVHASSGHKYSLKEALCDPTVASRLSDTKAAGEVKALDDFYKMLQHEPDRA
 FYGLKQVEKANEAMAIDTLLISDELFRHQDVATRSRYVRLVDSVKENAGTVRIFSSLHV
 SGEQLSQTGVAAILRFPVPELSDQEGDSSSEED (配列番号 132)

20

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 8】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、YBEYメタロペプチダーゼ(YBEY)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、YBEYポリペプチドは、

30

【化 1 2 1】

SLVIRNLQRVIPRRAPLR SKIEIVRRILGVQKFDLGIICVDNKNIQHINRIYRDRNVPTDVL
 SFPFHEHLKAGEFPQPDFDDYNLGDIFLGVEYIFHQCKENEDYNDVLTVTATHGLCHLL
 GFTHGTEAEWQQMFQKEKAVLDELGRRTGTRLQPLTRGLFGGS (配列番号 133)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 5 9】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、切断およびポリアデニル化特異的因子4様(CPSF4L)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、CPSF4Lポリペプチドは、

40

【化 1 2 2】

QEVIAGLERFTFAFEKDVEMQKGTGLLPFQGMK SASAVCNFFTKGLCEKGKLC PFRH
 DRGKMMVVCKHWLRGLCKKGDHCKFLHQYDLTRMPECYFYSKFGDCSNKECSFLHVK
 PAFKSQDCPWYDQGFCKDGPLCKYRHVPRIMCLNYLVGFCPEGPKCQFAQKIREFKLLP
 GSKI (配列番号 134)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 6 0】

50

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、hCG_2002731ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hCG_2002731ポリペプチドは、

【化123】

KLVRKNIKEDNAGQVTLVPEEPEDMWHYTNLVQVGDSLRASTIRKVQTESSTGSGVGSN
RVRTTLTLCVEAIDFDSQACQLRVKGTNIQENEYVKMGAYHTIELEPNRQFTLAKKQW
DSVVLERIEQACDPAWSADVAAVVMQEGLAHICLVTPSMTLTRAKVEVNIPRKRKGNC
SQHDRALERFYEQVVQAIQRHIHFDVVKCILVASPGFVREQFCDYMFQQAVKTDNKLLL
ENRSKFLQVHASSGHKYSLKEALCDPTVASRLSDTKAAGEVKALDDFYKMLQHEPDRA
FYGLKQVEKANEAMAIDTLLISDELFRHQDVATRSRYVRLVDSVKENAGTVRIFSSLHV
SGEQLSQLTGVAAILRFPVPELSDQEGDSSSEED (配列番号 135)

10

を含むまたはそれからなる。

【0261】

一部の実施形態では、hCG_2002731ポリペプチドは、

【化124】

DPAWSADVAAVVMQEGLAHICLVTPSMTLTRAKVEVNIPRKRKGNC'SQHDRALERFYEQVVQAIQRHIHFDVVKCILVASPGFVREQFCDYMFQQAVKTDNKLLLENRSKFLQVHAS
SGHKYSLKEALCDPTVASRLSDTKAAGEVKALDDFYKMLQHEPDRAFYGLKQVEKAN
EAMAIDTLLISDELFRHQDVATRSRYVRLVDSVKENAGTVRIFSSLHVS
SGEQLSQLTGVAAILRFPVPELSDQEGDSSSEED (配列番号 136)

20

を含むまたはそれからなる。

【0262】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、除去修復交差相補群1(ERCC1)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ERCC1ポリペプチドは、

30

【化125】

MDPGKDKEGVPQPSGPPARKKFVIPLDEDEVPPGVRGNPVLKFVRNVPWEFGDVIPDYV
LGQSTCALFLSLRYHNLHPDYIHGRLQSLGKNFALRVLLVQVDVKDPQQALKELAKMC
ILADCTLILAWSPEEAGRYLETYKAYEQKPADLLMEKLEQDFVSRVTECLTTVKSVNKT
DSQTLLTTFGSLEQLIAASREDLALCPGLGPQK (配列番号 137)

を含むまたはそれからなる。

【0263】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ras関連C3ボツリヌス毒素基質1アイソフォーム(RAC1)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RAC1ポリペプチドは、

40

【化126】

KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNV
CFQEKVTCKNGQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIVACEGSPYV
PVHFDASVEDST (配列番号 138)

を含むまたはそれからなる。

【0264】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、リボヌクレ

50

アーゼ A A 1 (R A A 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、 R A A 1 ポリペプチドは、

【化 1 2 7】

QDNSRYTHFLTQHYDAKPQGRDDRYCESIMRRRGLTSPCKDINTFIHGNKRSIKAICENK
NGNPHRENLRISKSSFQVTTCKLHGGSPWPPCQYRATAGFRNVVVACENGLPVHLDQSI
FRRP (配列番号 139)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 6 5】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、 R a s 関連タンパク質 (R A B 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、 R A B 1 ポリペプチドは、

【化 1 2 8】

GLGLVQPSYGQDGMVQRFLRQHVHPEETGGSDRYCNLMMQRRKMTLYHCKRFNTFIH
EDIWNIRSICSTTNIQCKNGKMNCHEGVVKVTDCRDTGSSRAPNCRYRAIASTRRVVIAC
EGNPQVPVHFDG (配列番号 140)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 6 6】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、 D N A 複製ヘリカーゼ / ヌクレアーゼ 2 (D N A 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、 D N A 2 ポリペプチドは、

【化 1 2 9】

XSAVDNILLKLAKFKIGFLRLGQIQKVHPAIQQFTEQEICRSKSIKSLALLEELYNSQLIVA
TTCMGINHPIFSRKIFDFCIVDEASQISQPICLGPLFFSRRFVLVGDHQQLPPLVLNREARA
LGMSESLFKRLEQNKSAVVQLTVQYRMNSKIMSLSNKLTIEGKLECGSDKVANAVINL
RHFKDVKLELEFYADYSDNPWLMGVFEPNNPVCFLNTDKVPAPEQVEKGGVSNVTEA
KLIVFLTSIFVKAGCSPSDIGIAPYRQQLKIINDLLARSIGMVEVNTVDKYQGRDKSIVLV
SFVRSNKDGTVGELLKDWRRLLNVAITRAKHKLILLGCVPSLNCYPPLEKLLNHLNSEKLI
SFFFCIWSHLIALL (配列番号 141)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 6 7】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、 F L J 3 5 2 2 0 ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、 F L J 3 5 2 2 0 ポリペプチドは、

【化 1 3 0】

MALRSHDRSTRPLYISVGHMSLEAAVRLTCCCFRRIPEPVRQADICREHIRKSLGLP
GPPTPRSPKAQRPVACPKGDSGESSALC (配列番号 142)

を含むまたはそれからなる。

【 0 2 6 8】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の R N A 結合性タンパク質は、 F L J 1 3 1 7 3 ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、 F L J 1 3 1 7 3 ポリペプチドは、

10

20

30

40

【化 1 3 1】

CYTNHALSYDQAKRVPRWVLEHISKSKIMGDADRKHCKFKPDPNIPPTFSAFNEDYVGS
 GWSRGHMAPAGNNKFSSKAMAETFYLSNIVPQDFDNNSGYWNRIEMYCRELTERFEDV
 WVVSGPLTLPQTRGDGKKIVSYQVIGEDNVAVPSHLYKVLARRSSVSTEPLALGAFVV
 PNEAIGFQPQLTEFQVSLQDLEKLSGLVFFPHLDRT (配列番号 143)

を含むまたはそれからなる。

【0 2 6 9】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、テニユーリン膜貫通タンパク質 (T E N M) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、テニユーリン膜貫通タンパク質 1 (T E N M 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、T E N M 1 ポリペプチドは、

10

【化 1 3 2】

VTVSQMTSVLNGKTRRFADIQLQHGCALCFNIRYGTTVVEEKNHVLEIARQRAVAQAWT
 KEQRRLOEGEGIRAWTEGEKQQLLSTGRVQGYDGYFVLSVEQYLELSDSANNIHFMR
 QSEIGRR (配列番号 144)

を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、テニユーリン膜貫通タンパク質 2 (T E N M 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、T E N M 2 ポリペプチドは、

20

【化 1 3 3】

TVSQPTLLVNGKTRRFTNIEFQYSTLLLSIRYGLTPDTLDEEKARVLDQARQRALGTAW
 AKEQQKARDGREGSRLWTEGEKQQLLSTGRVQGYEGYYVLPVEQYPELADSSSNIQFL
 RQNEMGKR (配列番号 145)

を含むまたはそれからなる。本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、リボヌクレアーゼカッパ (R N A s e K) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、R N A s e K ポリペプチドは、

30

【化 1 3 4】

MGWLPRGPRPLCPPARASWAFSHRFPSPLAPRRSPTPFMASLLCCGPKLAACGIVLSA
 WGVIMLIMLGIFFNVHSAVLIEDVPFTEKDFENGPNQNIYNLYEQVSYNCFIAAGLYLLLG
 GFSFCQVRLNKRKEYMVR (配列番号 204)

を含むまたはそれからなる。

【0 2 7 0】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) ポリペプチドまたはそのヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、T A L E N ポリペプチドは、

40

【化 1 3 5 - 1】

1 MRIGKSSGWL NESVSLEYEH VSPPTTRPRDT RRRPRAAGDG GLAHLHRRRLA VGYAEDTPRT
 61 EARSPPARRP LPVAPASAPP APSLVPEPPM PVSLPAVSSP RFSAGSSAAI TDPFPSLPPT
 121 PVLYAMAREL EALSDATWQP AVPLPAEPPT DARRGNTVFD EASASSPVIA SACPQAFASP
 181 PRAPRSARAR RARTGGDAWP APTFLSRPSS SRIGRDVFGK LVALGYSREQ IRKCLKQESLS

【化 1 3 5 - 2】

241 EIAKYHTTLT GQGFTHADIC RISRRRQSLR VVARNYPELA AALPELTRAH IVDIARQRSG
 301 DLALQALLPV ATALTAAPLR LSASQIATVA QYGERPAIQA LYRLRRKLTR APLHLTPQQV
 361 VAIASNTGGK RALEAVCVQL PVLRAAPYRL STEQVVAIAS NKGGKQALEA VKAHLDDLGG
 421 APYVLDTQV VAIASHNGGK QALEAVKADL LDLRGAPYAL STEQVVAIAS HNGGKQALEA
 481 VKADLLELRG APYALSTEQV VAIASHNGGK QALEAVKAHL LDLRGVPYAL STEQVVAIAS
 541 HNGGKQALEA VKAQLLDLRG APYALSTAQV VAIASNGGGK QALEGIGEQL LKLRTAPYGL
 601 STEQVVAIAS HDGGKQALEA VGAQLVALRA APYALSTEQV VAIASNKGGK QALEAVKAQL
 661 LELRGAPYAL STAQVVAIAS HDGGNQALEA VGTQLVALRA APYALSTEQV VAIASHDGGK
 721 QALEAVGAQL VALRAAPYAL NTEQVVAIAS SHGGKQALEA VRALFPDLRA APYALSTAQL
 781 VAIASNPGGK QALEAVRALF RELRAAPYAL STEQVVAIAS NHGGKQALEA VRALFRGLRA
 841 APYGLSTAQV VAIASSNGGK QALEAVWALL PVLRAATPYDL NTAQIVAIAS HDGGKPALEA
 901 VWAKLPVLRG APYALSTAQV VAIACISGQQ ALEAIEAHMP TLRQASHLS PERVAIACI
 961 GGRSAVEAVR QGLPVKAIRR IRREKAPVAG PPPASLGPTP QELVAVLHFF RAHQQPRQAF
 1021 VDALAAFQAT RPALLRLLSS VGVTEIEALG GTIPDATERW QRLGLRGLFR PATGAAAPSP
 1081 DSLQGFAQSL ERTLGSFGMA GQSACSPHRK RPAETAIAPR SIRRSPNAG QPSEPFPDQL
 1141 AWLQRRKRTA RSHIRADSAA SVPANLHLGT RAQFTPDLR AEPGPIMQAH TSPASVSFGS
 1201 HVAFEPGLPD PGTPTSADLA SFEAEPFGVG PLDFHLDWLL QILET (配列番号 205)

10

を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、T A L E N ポリペプチドは、

【化 1 3 6】

1 mdpirsrtps parellpgpq pdrvqptadr ggappaggl dglparrtms rtrlpsppap
 61 spafsfagsfs dllrqfdpsl ldtslldsmp avgtphataa paecdevqsg lraaddpppt
 121 vrvavtaarp prakpaprrr aaqpsdaspa aqvdlrtlgy sqqqqekikp kvgstvaqhh
 181 ealvgghgft ahivalsrhp aalgtvavky qdmiaalpea thedivgvkq qwsgaralea
 241 lltvagelrv pplqldtgql vkiakrgvvt aveavhasrn altgaplnlt paqvaiasn
 301 nggkqaletv qrllpvlcqa hgltpaqvva iashdggkqa letmqrlpvl lcqahglppd
 361 qvvaiasnig gkqaletvqr llpvlcqaqhg ltpdqvvaia shggkqale tvqrllpvlc
 421 qahgltpdqv vaiashdggk qaletvqrll pvlcqaqhgt pdqvaiasn gggkqaletv
 481 qrllpvlcqa hgltpdqvva iasnggkqal etvqrllpvl cqahgltpdq vvaiashdgg
 541 kqaletvqrl lpvlcqthgl tpaqvaias hdggkqalet vqllpvlcqa ahgltpdqv
 601 aiasniggkq alatvqrllp vlcqahgltp dqvvaiasng ggkqaletvq rllpvlcqa
 661 gltpdqvvai asngggkqal etvqrllpvl cqahgltpdq vvaiasnigg kqaletvqrl
 721 lpvlcqahgl tpaqvaias hdggkqalet vqrllpvlcqa ahgltpdqvv aiasngggkq
 781 aletvqrllp vlcqahgltp eqvvaianas nggkqaletvq rllpvlcqa hgltpdqvvai
 841 asngggkqal etvqrllpvl cqahgltpaq vvaiasnigg kqaletvqrl lpvlcqdhgl
 901 tlaqvaias niggkqalet vqrllpvlcqa ahgltpdqvv aiasniggkq aletvqrllp
 961 vlcdqdhgltp dqvvaiasni ggkqaletvq rllpvlcdqh gltldqvva iasnggkqale
 1021 tvqrllpvlc qdhgltpdqv vaiasngggk qaletvqrll pvlcdqdhgt pnqvaiasn
 1081 ggkqaletiv aqlsrpdpal aaltndhlva laclggrpam davkkglpha pelirrvnrr
 1141 igertshrva dyaqvvrvle ffqchshpay afdeamtqfg msrnglvqlf rrvgttelea
 1201 rggtlppasq rwrdrilqasg mkrakpspts aqtpdqash afadslerdl dapspmhegd
 1261 qtgassrkrs rsdravtgps aqhsfevrp eqrdalhlpl swrvkrprtr iggglpdpgt
 1321 piaadlaass tvmweqdaap fagaaddfpa fneelawlm ellpqsgsvg gti
 (配列番号 206)

20

30

を含むまたはそれからなる。

【0 2 7 1】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、ジンクフィン
 ンガーヌクレアーゼポリペプチドまたはそのヌクレアーゼドメインを含むまたはそれから
 なる。一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、Z N F 6 3 8 ポリペプチ
 ドまたはそのヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、Z
 N F 6 3 8 ポリペプチドポリペプチドは、

40

【化 1 3 7 - 1】

1 MSRPRFNPRG DFPLQRPRAP NPSGMRPPGP FMRPGSMGLP RFYPAGRARG IPHRFAGHES
 61 YQNMGPMQRMN VQVTQHRTPD RLTKEKLDHFH EAQQKKGKPH GSRWDDEPHI SASVAVKQSS

【化 1 3 7 - 2】

121 VTQVTEQSPK VQSRYTEKESA SSILASFGLS NEDLEELSRV PDEQLTPENM PLILRDIRMR
181 KMGRRLPNLP SQSRNKETLG SEAVSSNVID YGHASKYGYT EDPLEVRIYD PEIPTDEVEN
241 EFQSQONISA SVPNPNVICN SMFPVEDVFR QMDFPGESSN NRSFFSVESG TKMSGLHISG
301 GQSVLEPIKS VNQSINQTVS QTMSQSLIPP SMNQPFSSSE LISSVSQQER IPHEPVINSS
361 NVHVGSRGSK KNYQSQADIP IRSPFGIVKA SWLPKFSHAD AQKMKRLPTP SMMNDYYAAS
421 PRIFPHLCSL CNVECSHLKD WIQHQNTSTH IESCRQLRQQ YPDWNPEILP SRNENGRKE
481 NETPRRRSHS PSPRRSRRSS SSHRFRRSRS PMHYMYRPRS RSPRICHRFI SRYRSRSRSR
541 SPYRIRNPER GSPKCFRSVS PERMSRRSVR SDRKKALED VVQSRGHTG FNKQKHLEAA
601 DKGHSPAQKP KTSSGKPSV KPTSATKSDS NLGGHSIRCK SKNLEDDTLS ECKQVSDKAV
661 SLQRKLRKEQ SLHYGSVLLI TELPEDGCTE EDVRKLFQPF GKVNDVLIVP YRKEAYLEME
721 FKEAITAIMK YIETTPITIK GKSVKICVPG KKKAQNKEVK KKTLESKKVS ASTLKRDATA
781 SKAVEIVTST SAAKTGQAKA SVAKVNKSTG KSASSVKSUV TVAVKGNKAS IKTAKSGGKK
841 SLEAKKTGNV KNKDSNKPVT IPENSEIKTS IEVKATENCA KEAISDAALE ATENEPLNKE
901 TEEMCVMLVS NLPNKGYSVE EVYDLAKPFG GLKDILILSS HKKAYIEINR KAAESMVKFY
961 TCFPVLMDGN QLSISMAPEN MNIKDEEAF ITLVKENDPE ANIDTIYDRF VHLNLPEDG
1021 LQCVLQVGLQ FGKVDHVFVI SNRNKAILQL DSPESAQSMY SFLKQNPQNI GDHMLTCSLS
1081 PKIDLPEVQI EHDPELEKES PGLKNSPIDE SEVQTATDSP SVKPNELEEE STPSIQTEITL
1141 VQQEEPCEEE AEKATCDSDF AVETLELETQ GEEVKEEIPL VASASVSIEQ FTENAEECAL
1201 NQQMFNSDLE KKGAEIINPK TALLPSDSVF AEERNLKGIL EESPSEAEDE ISGITQTMVE
1261 AVAEVEKNET VSEILPSTCI VTLVPGIPTG DEKTVDKKNI SEKKGNMDEK EEKEFNTKET
1321 RMDLQIGTEK AEKNEGRMDA EKVEKMAAMK EKPAENTLFK AYPNKGVGQA NKPDETSKTS
1381 ILAVSDVSSS KPSIKAVIVS SPKAKATVSK TENQKSFPKS VPRDQINAEK KLSAKEFGLL
1441 KPTSARSGLA ESSSKFKPTQ SSLTRGGSGR ISALQGKLSK LDYRDITKQS QETEARPSIM
1501 KRDDSNKTL AEQNTKNPKS TTGRSSKSKE EPLFPFNLDE FVTVDEVIEE VNPSQAKQNP
1561 LKGKRKETLK NVPFSELNLK KKKGKTSTPR GVEGELSFVT LDEIGEEEDA AAHLAQALVT
1621 VDEVIDEEEL NMEEMVKNSN SLFTLDELID QDDCISHSEP KDVTVLSVAE EQDLLKQERL
1681 VTVDEIGEVE ELPLNESADI TFATLNTKGN EGDTVRSIG FISSQVPEDP STLVTVDEIQ
1741 DDSSDLHLVT LDEVTEEDED SLADFNNLKE ELNFVTVDEV GEEEDGDNDL KVELAQSKND
1801 HPTDKKGNRK KRAVDTKKTK LESLSQVGPV NENVMEEDLK TMIERHLTAK TPTKRVIRIG
1861 TLPSEKAVVT EPAKGEEAFQ MSEVDEESGL KDSEPERKRK KTEDSSSGKS VASDVPEELD
1921 FLVPKAGFFC PICSLFYSGE KAMTNHCKST RHKQNTKFKM AKQRKEKEQN EAEERSSR

10

20

(配列番号 207)

を含むまたはそれからなる。

【0 2 7 2】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 2 の RNA 結合性タンパク質は、一般にテロ
メラゼ結合性タンパク質 EST 1 A アイソフォーム 3、NCBI 参照配列：NP__00
1 2 4 3 7 5 6 . 1 としても公知のヒト SMG 6 タンパク質に由来する PIN ドメインを
含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、h SMG 6 由来の PIN は、本明細書で
は、Cas 融合タンパク質の形態で、内部対照として使用される。例えば、これだけに限
定することなく、PIN - d S a u C a s 9、PIN - d S a u C a s 9 d H N H、P I
N - d S P C a s 9、および d c j e C a s 9 - P I N を示す図 9 を参照されたい。

30

【0 2 7 3】

本開示の組成物の一部の実施形態では、組成物は、(a) RNA 分子の内部に特異的に
結合する g RNA を含む配列および (b) ヌクレアーゼをコードする配列をさらに含む。
一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、CRISPR / Cas タンパク質から単離された
またはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、CRISPR / Cas タンパク
質は、I 型、I A 型、I B 型、I C 型、I D 型、I E 型、I F 型、I U 型、I I I 型、I
I I A 型、I I I B 型、I I I C 型、I I I D 型、I V 型、I V A 型、I V B 型、I I 型
、I I A 型、I I B 型、I I C 型、V 型、または V I 型 CRISPR / Cas タンパク質
のいずれか 1 つから単離されるまたはそれに由来する。一部の実施形態では、ヌクレアー
ゼは、TALEN またはそのヌクレアーゼドメインから単離されたまたはそれに由来する
配列を含む。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼまた
はそのヌクレアーゼドメインから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。

40

融合タンパク質

【0 2 7 4】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、組成物は、(a) 第 1 の RNA 結合

50

性ポリペプチドをコードする配列またはその一部と、(b)第2のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列とを含む標的RNA結合性融合タンパク質をコードする配列を含み、ここで、第1のRNA結合性ポリペプチドは、標的RNAに結合し、第2のRNA結合性ポリペプチドは、RNAヌクレアーゼ活性を含む。

【0275】

一部の実施形態では、標的RNA結合性融合タンパク質は、RNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質である。RNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質は、RNA結合性ポリペプチドを標的RNAへガイドするgRNAに対応する少なくとも1つのRNA結合性ポリペプチドを含む。RNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質としては、これだけに限定することなく、CRISPR/Cas

10

【0276】

一部の実施形態では、標的RNA結合性融合タンパク質は、RNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質ではなく、したがって、対応するgRNA配列を有さない標的RNAに結合することができる少なくとも1つのRNA結合性ポリペプチドを含む。そのようなガイドされないRNA結合性ポリペプチドとしては、限定することなく、PUF(PumilioおよびFBFホモロジーファミリー)である少なくとも1つのRNA結合性タンパク質またはそのRNA結合性部分が挙げられる。この型のRNA結合性ポリペプチドを、CRISPR/CasなどのgRNAによりガイドされるRNA結合性タンパク質の代わりに使用することができる。mRNAの安定性および翻訳の媒介に関するPUFタンパク質(*Drosophila Pumilio*および*C. elegans fem-3*結合因子に由来する)の独特のRNA認識方式は当技術分野で周知である。同じく当技術分野で公知のヒトPumilio1のPUFドメインは同族RNA配列に密接に結合し、また、その特異性は改変することができる。ヒトPumilio1のPUFドメインは、8つの連続したRNA塩基を認識する8つのPUFリピートを含み、各リピートが一塩基を認識する。各リピート内の2つのアミノ酸側鎖は、対応する塩基のワトソン・クリック端を認識し、そのリピートの特異性が決定されるので、PUFドメインは、最大の8ntのRNAに特異的に結合するように設計することができる。Wang et al., Nat Methods. 2009; 6 (11): 825-830. その全体が参照により本明細書に組み

20

30

【0277】

本開示のガイドされないRNA結合性融合タンパク質の一部の実施形態では、融合タンパク質は、PUMBY(Pumilioに基づくアセンブリ)タンパク質である少なくとも1つのRNA結合性タンパク質またはそのRNA結合性部分を含む。RNAを標的とするためネイティブな形態および改変された形態で広く使用されているRNA結合性タンパク質PumHD(PUFファミリーのメンバーであるPumilio相同性ドメイン)が操作されて、それぞれが1つのRNA塩基を標的とする4つの標準的なタンパク質モジュールのセットがもたらされた。これらのモジュール(すなわち、Pumilioに基づくアセンブリに関してはPumby)を、所望の標的RNAに結合するように様々な組成および長さの鎖に連結することができる。そのようなPumby-RNA相互作用の特異性は高く、Pumby鎖の、標的配列から3つまたはそれよりも多くのミスマッチを有するRNA配列への結合は検出不可能である。Katarzyna et al., PNAS, 2016; 113 (19): E2579-E2588. その全体が参照により本明細書に組み込まれるUS2016/0238593も参照されたい。

40

【0278】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、PumilioおよびFBF(PUF)タンパク質を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、Pumilioに基づくアセンブリ(PUMBY)タンパク質を含む。一部の実施形態では、本開示のPUF1タンパク質は、

50

【化 1 3 8】

MDKSKQMNIN	NLSNIFEVID	PGITIPYEE	EYENNGESNS	QLQQQPQKLG	SYRSRAGKFS	60
NTLSNLLPSI	SAKLHHSKKN	SHGKNCAEFS	SSNNSSQSTV	ASKTFPRASPS	RSKMMESSID	120
GVTMDRPGSL	TPPQDMEKLV	HFPDSSNNFL	IPAPRGSSDS	ENLEPHQISRT	RNNTMSSQIT	180
SISSIAPKPR	TSSGIWSSNA	SANDEMQOHL	LQQLQPTTSN	NTTNSNTLND	YSTKTAYFDN	240
MVSTSGSQMA	DNKMNTNNLA	IPNSVWSNTR	QRSQSNASSI	YTDAPLYEQP	ARASISSHYT	300
IPTQESPLIA	DEIDFQSINW	VTMDPTVPSI	NQISNLLPTN	TISISNVEPL	QHQQPQLNNA	360
INLFTSTLAT	LCSSKYGEVIS	ARTLRNLNMA	LVEFSSVESA	VKALDSLQCK	EVSMIGAPSK	420
ISFAKILFMH	QOPPOFLLNS	QGLPLGLENN	NLQOPQLLQE	QLFNGAVTFQ	QQGNVSIPIV	480
NQQSQSQSQHQ	NHSSGSAGFS	NVLHGYNNNN	SMHGNNNNSA	NEKEQCPFPL	PPPNVNEKED	540
LLREIIELEF	ANSDEYQINS	LIKKSILNHKG	TSDTQNFQPL	PEPLSGREFD	PPKLRRLRKS	600
IDSNAFSDLE	IEQLAIAMLD	ELPELSSDYL	GNTIVQKLF	HSSDIKDIM	LRKTSKYLFS	660
MGVHKNGTWA	CQKMITMAHT	PRQIMQVTQG	VKDYCTPLIN	DQFGNYVIQC	VLKFGFPWNQ	720
FIFESIIANF	WVIVQNRIGA	RAVRACLEAH	DIVTPEQSIV	LSAMIVTYAE	YLSTNSNGAL	780
LVTWFLDTSV	LPNRHSILAP	RLTKRIVELC	GHRLASLTIL	KVLNYRGDDN	ARKIILDSLF	840
GNVNAHDSSP	PKELTKLLCE	TNYGPTFVHK	VLAMPLLEDD	LRAHIKQVR	KVLTDDSTQIQ	900
PSRRLLEEVG	LASPSSTHNC	TKQQQQQHHN	SSISHMFATP	DTSQGQMRGL	SVSSVKSGGS	960
KHTTMNTTTT	NGSSASTLSP	GOPLNANSNS	SMGYFSYPGV	FPVSGFSGNA	SNGYAMNDD	1020
LSSQFDMLNF	NNGTRLSLPQ	LSLTNHNNNT	MELVNNVGVSS	QPHTNNNNNN	NNTNYNDNT	1080
VFETLTLHSA	N					1091

(配列番号 209)

のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の P U F 3 タンパク質は、

【化 1 3 9】

1	MEMNMDMDMD	MELASIVSSL	SALSHSNNNG	GQAAAAGIVN	GGAAGSQQIG	GFRSSSFTTA	
61	NEVDSEILLL	HGSSESSPIF	KKTALSOGTA	PPFSTNSKKE	FGNGGNYQY	RSTDTASLSS	
121	ASYNNYHTHH	TAANLGKNNK	VNHLGQYSA	SIAGPVYYNG	NDNNNSGGEG	FFKFGKSLI	
181	DGTRELESQD	RPDAVNTQSQ	FISKSVSNAS	LDTQNTFEQN	VESDKNFNKL	NRNTTNSGSL	
241	YHSSNSGSS	ASLESENAHY	PKRNIWNVAN	TPVFRPSNNP	AAVGATNVAL	PNQQDGPANN	
301	NFPYMGFF	PNQFHQGPY	QNFNYLIGS	PSNFISQMIS	VQIPANEDTE	DSNGKKKKA	
361	NRPSVSSPS	SPPNNSPFPF	AYPNPMFMP	PPPLSAPQQQ	QQQQQQQQQE	DQQQQQQQEN	
421	PYIYPTPNP	IPVKMPKDEK	TEKKRNKNH	PANNSNANK	QANPYLENSI	PTKNTSKKNA	
481	SSKSNESTAN	NHKSHSHSH	HSQSLQQQQQ	TYHRSPILLEQ	LRNSSSDKNS	NSNMSLKDIF	
541	GHSLEFCKDQ	HGSRFIQREL	ATSPASEKEV	IFNEIRDDAI	ELSDNVFGNY	VIQKFFFEFGS	
601	KIQKNTLVDQ	FKGNMKQLSL	QMYACRVIQK	ALEYIDSNQR	IELVLELSDS	VLQMIKDQNG	
661	NHVIQKAIET	IPIEKLPFIL	SSLTGHYHL	STHSYGCRVI	QRLLFEFGSE	DQESILNELK	
721	DFIPYLIQDQ	YGNVYIQYVL	QQDQFTNKEM	VDIKQEIET	VANNVVEYSK	HKFASNVVEK	
781	SILYGSKNQK	DLIISKILPR	DKNHALNLED	DSPMILMIKD	QFANYVIQKL	VNVSEGEKK	
841	LIVIAIRAYL	DKLNKNSNLG	NRHLASVEKL	AALVENAEV	(配列番号 210)		

のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の P U F 4 タンパク質は、

【化 1 4 0】

1	MSTKGLKEEI	DDVPSVDFVV	SETVNSALEQ	LQLDDPEENA	TSNAFANKVS	QDSQFANGPP	
61	SQMFPHQMM	GGMGFMPYSQ	MMQVPHNFCP	FFPPDFNDF	TAPLSSSPLN	AGGPPMLFKN	
121	DSLFPQMLSS	GAAVATQGGQ	NLNPLINDNS	MKVLPIASAD	PLWTHSNVPG	SASVAIEETT	
181	ATLQESLPSK	GRESNNKASS	FRRQTFHALS	PTDLINAANN	VTLSKDFQSD	MQNFSAKAKP	
241	SVGANNTAKT	RTQSISFDNT	PSSTSFIPPT	NSVSEKLSDF	KIETSKEDLI	NKTAPAKKES	
301	PTTYGAAYPY	GGPLLQPNPI	MPGHPHNISS	PIYGIRSPFP	NSYEMGAQFQ	PFSPILNPTS	
361	HSLNANSPIP	LTQSPIHLAP	VLNPSNSVA	FSDMKNDGGK	PTTDNDKAGP	NVRMDLINPN	
421	LGPSMQPFHI	LPPQONTPPP	PWLYSTPEPF	NAMVEPHLLA	QNHMPLMNSA	NNKHGRRNN	
481	SMSSHNDNDN	IGNSNYNNKD	TGRSNVGMK	NMKNSYHGY	NNNNNNNNNN	NNNNNSMATN	
541	SNSAEKQRKI	EESSRFADAV	LDQYIGSIHS	LCKDQHGCRF	LQKQLDILGS	KAADAFIET	
601	KDYTVELMTD	SFGNYLIQKL	LEEVTTEQRI	VLTKISSPHF	VEISLNPHGT	RALQKLIET	
661	KTDEEAQIVV	DSLRPYTVQL	SKDLNGNHVI	QKCLQRLKPE	NFQFIFDAIS	DSCIDIATHR	
721	HGCCVLQRCL	DHGTTEQCDN	LCDKLLALVD	KLTLDPFGNY	VVQYIITKREA	EKNKYDYTHK	
781	IVHLLKPRAI	ELSIHKFGSN	VIEKILKTAI	VSEPMILEIL	NNGGETGIQS	LLNDSYGNVY	
841	LQTALDISHK	QNDYLYKRLS	EIVAPLLVGP	IRNTPHGKRI	IGMLHLDS	(配列番号 211)	

のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の P U F 5 タンパク質は、

10

20

30

40

50

【化 1 4 1】

1 MSDSTGRINS KASDSSSISD HQTADLSIFN GSFDDGAFSS SNIPLENFIMG TGNQRFQYSP
 61 HPEAKSSDPC RLAALTPSTP KGPLNLTPAD FGLADFSVGN ESFADEFTANN TSFVGNVQSN
 121 VRSTRLLPAW AVDNSGNIRD DLTLQDVVSN GSLIDFAMDR TGVKFLERHF PEDHDNEMHF
 181 VLFDKLTEQG AVFTSLCRSA AGNFIIQKFV EHATLDEQER LVRKMCNGL IEMCLDKFAC
 241 RVVQMSIQKF DVSIAMKLV KISSLDLFLPL CTDQCAIHVL QKVVKLLPIS AWSFFVKFLC
 301 RDDNLMTVCQ DKYGCRLVQQ TIDKLSDNPK LHCENFRLQL LHGLMTSVAR NCFRLSSNEF
 361 ANYVQYVIK SSGVMEMYRD TIEKCLLRN ILSMSQDKYA SHVVEGAFLE APPLLLSEMM
 421 DEIFDGYVKD QETNRDALDI LLFHQYGNV VQOMISICIS ALLGKEERKM VASEMRLYAK
 481 WFDRIKNRVN RHSGRLERFS SGKKIIESLQ KLNVPMTMTN EPMPYWAMPT PLMDISAHFM
 541 NKLNFQKNSV FDE (配列番号 212)

10

のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の P U F 6 タンパク質は、

【化 1 4 2 - 1】

1 MFPNRRSTDS YNMLGASFDF DPDFSLLSNK THKNKNPKPP VKLLPYRHGS NTTSSDLNDY

【化 1 4 2 - 2】

61 IFNSGSGSSD DETPPPAAPI FISLEEVLLN GLLIDFAIDP SGVKFLEANY PLDSEDQIRK
 121 AVFEKLETEST TLFVGLCHSR NGNFIVQKLV ELATPAEQRE LLRQMIDGGL LVMCKDKFAC
 181 RVVQLALQKF DHSNVFQLIQ ELSTFDLAAM CTDQISIHVI QRVVKQLPVD MWTFVHFLS
 241 SGDSLMAVCQ DKYGCRLVQQ VIDRLAENPK LPCFKFRIQL LHSLMTCIVR NCFRLSSNEF
 301 ANYVIQYVIK SSGIMEMYRD TIIDKCLLRN LLSMSQDKYA SHVIEGAFLE APPALLHEMM
 361 EEIFSGYVKD VELNRDALDI LLFHQYGNV VQOMISICTA ALIGKEERQL PPAILLLYSG
 421 WYEKMKQKRVL QHASRLERFS SGKKIIDSVM RHGVPTAAAI NAQAAPSLME LTAQFDAMFP
 481 SFLAR (配列番号 213)

20

のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の P U F 7 タンパク質は、

【化 1 4 3】

1 MFPNRRSTDS YNMLGASFDF DPDFSLLSNK THKNKNPKPP VKLLPYRHGS NTTSSDSDSY
 61 IFNSGSGSSD AETPAPVAPI FISLEDVLLN GQLIDFAIDP SGVKFLEANY PLDSEDQIRK
 121 AVFEKLETEST TLFVGLCHSR NGNFIVQKLV ELATPAEQRE LLRQMIDGGL LAMCKDKFAC
 181 RVVQLALQKF DHSNVFQLIQ ELSTFDLAAM CTDQISIHVI QRVVKQLPVD MWTFVHFLS
 241 SGDSLMAVCQ DKYGCRLVQQ VIDRLAENPK LPCFKFRIQL LHSLMTCIVR NCFRLSSNEF
 301 ANYVIQYVIK SSGIMEMYRD TIIDKCLLRN LLSMSQDKYA SHVIEGAFLE APPALLHEMM
 361 EEIFSGYVKD VESNRDALDI LLFHQYGNV VQOMISICTA ALIGKEEREL PPAILLLYSG
 421 WYEKMKQKRVL QHASRLERFS SGKKIIDSVM RHGVPTAAAV NAQAAPSLME LTAQFDAMFP
 481 SFLAR (配列番号 214)

30

のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の P U F 8 タンパク質は、

【化 1 4 4】

1 MSRPISIGNT CTFDPSASPI ESLGRSIGAQ KIVDSVCGSP IRSYGRHIST NPKNERLPDT
 61 PEFQFATYMH QGGKVIQNT LHMFGTPPSC YCAQENIPIS SNVGHVLTSTI NNNYMNHQYN
 121 GSNMFSNQMT QMLQAQAYND LQMHQAHSQS IRVFPQPSAT GIFSNEYREP TTTDDLTRY
 181 RANPAMKKNL KLSDIRGALL KFAKDQVGSR FIQQELASSK DRFEKDSIFD EVVSNADLV
 241 DDIFGNYVVQ KFFEYGEERH WARLVDALID RVPEYAFQMY ACRVLQKALE KINEPLQIKI
 301 LSQIRHVIHR CMKDQNGNHV VQKAIEKVSP QYVQFIVDTL LESSNTIYEM SVDPYGCRVV
 361 QRCLEHCSPS QTKFVIGQIH KRFEIANNQ YGNVYVQHV I EHGSEEDRMV IVTRVSNLFL
 421 EFATHKYSSN VIEKCLEQGA VYHKSIVGA ACHHQEGSVP IVVQMMKDQY ANYVQKMPD
 481 QVTSEQRREL ILTVRPHIPV LRQFPHGKHI LAKLEKYFQK PAVMSYPYQD MQGSH

40

(配列番号 215)

のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示の P U F 9 タンパク質は、

【化 1 4 5】

```

1 MADPNWAYAP PTNYYADHSI AKPIMISGGH PSQDQGHSPK SESFGQSVTT AFNGMVDNLV
61 GSPSSSVQQR NYFTTTFPFI SRSENDNRND KIMNGSYGV FIPIDQGVF QGTFDFQMTF
121 FLOQGGHLIG GSPNGPVQVS GNWYSGGAGI FSTMQQADPS NGMPGMAAEF VNNENGMFPGF
181 NGMHQQAMIS GSPPFFPYQNM MNLTTSEFGAM GLGPPQIQQR DPQMFQQPIL HEPIQGMQON
241 GFGQQVFFTQ MQNQQHPOGQ AQQQLQQLAQ QHQQQONSQQ FFGQGPNGMG NGCVMNDWSQ
301 RSEFGMPQQA QQNGLPNFS QNPPRRRGPE DPNGQTPKTL QDIKNNVIEF AKDQHGSRFI
361 QOKLERASLR DKAALFTPV L ENAEELMTDV FGNVVIQKFF EFGNNEQRNQ LVGTIRGNVM
421 KLALQMYGCR VIQKALEYVE EKYQHEILGE MEGQVLKCVK DQNGNHVIQK VIERVEPERL
481 QFIIDAFTKN N3DNVYTLV HPGYGRVIQR VLEYCNEEQK QPVLDALQIH LKQLVLDQYG
541 NYVIQHVIEH GSPSDKEQIV QDVISDDLK FAQHKEASNV IEKCLTFGGH AERNLLIDKV
601 CGDPNDPSPF LLQMMKDPFA NYVVQKMLDV ADPQHRKKIT LTIKPHIATL RKNYFGKHIL
661 LKLEKYFAKQ APANSSNSSS NDQIYHSPF DIPLGADFSN HPF ( 配列番号 216)

```

10

のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

【0 2 7 9】

本開示の組成物の一部の実施形態では、RNA 結合性タンパク質またはその RNA 結合性部分の少なくとも 1 つは、PPR タンパク質である。PPR タンパク質（植物に由来するペントトリコペプチドリピート（PPR）モチーフを有するタンパク質）は、核にコードされ、RNA レベルで、細胞小器官（葉緑体およびミトコンドリア）、切り取り（cutting）、翻訳、スプライシング、RNA の編集、RNA 安定性に特異的に作用する遺伝子を排他的に制御する。PPR タンパク質は、一般には、35 アミノ酸のモチーフであり、PPR モチーフが約 10 個の連続したアミノ酸である構造を有する。PPR モチーフの組合せを RNA への配列選択的結合に使用することができる。PPR タンパク質は、多くの場合、約 10 リピートドメインの PPR モチーフで構成される。PPR ドメインまたは RNA 結合性ドメインは、触媒として不活性になるように構成することができる。その全体が参照により本明細書に組み込まれる WO 2013/058404。

20

【0 2 8 0】

一部の実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質は、少なくとも 2 つの RNA 結合性ポリペプチド間のリンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、ペプチドリリンカーである。一部の実施形態では、ペプチドリリンカーは、トリペプチド GGS の 1 つまたは複数のリピートを含む。他の実施形態では、リンカーは、非ペプチドリリンカーである。一部の実施形態では、非ペプチドリリンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、co-ポリ（エチレン/プロピレン）グリコール、ポリオキシエチレン（POE）、ポリウレタン、ポリホスファゼン、多糖、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルエチルエーテル、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリシアノアクリレート、脂質ポリマー、キチン、ヒアルロン酸、ヘパリン、またはアルキルリンカーを含む。

30

【0 2 8 1】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つの RNA 結合性タンパク質は、RNA 結合活性のために多量体形成を必要としない。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの RNA 結合性タンパク質は、多量体複合体の単量体ではない。一部の実施形態では、多量体タンパク質複合体は、RNA 結合性タンパク質を含まない。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの RNA 結合性タンパク質は、RNA 分子内の標的配列に選択的に結合する。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの RNA 結合性タンパク質は、RNA 分子内の第 2 の配列に対する親和性を含まない。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの RNA 結合性タンパク質は、RNA 分子内の第 2 の配列に対して高い親和性を含まずそれに選択的に結合しない。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの RNA 結合性タンパク質は、終点を含めて、2 アミノ酸から 1300 アミノ酸の間を含む。

40

【0 2 8 2】

一部の実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質の少なくとも 1 つの RNA 結合性タンパク質は、核局在化シグナル（NLS）をコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、核局在化シグナル（NLS）は、RNA 結合性タンパク質に対して 3'

50

側に位置する。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、NLSをC末端に含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、第1のNLSをコードする第1の配列および第2のNLSをコードする第2の配列をさらに含む。一部の実施形態では、第1のNLSまたは第2のNLSは、RNA結合性タンパク質に対して3'側に位置する。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、第1のNLSまたは第2のNLSをC末端に含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、NES（核外輸送シグナル）または他のペプチドタグまたは分泌シグナルをさらに含む。

【0283】

一部の実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質は、第1のRNA結合性タンパク質として少なくとも1つのRNA結合性タンパク質を含み、それと共に、ヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる第2のRNA結合性タンパク質を含む。

10

【0284】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、第1のRNA結合性ポリペプチドのC末端において第1のRNA結合性ポリペプチドに対して作動可能に構成されている。一部の実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、第1のRNA結合性ポリペプチドのN末端において第1のRNA結合性ポリペプチドに対して作動可能に構成されている。例えば、そのような例示的な融合タンパク質の1つは、RNAse1（R39D、N67D、N88A、G89D、R19D、H119N、K41R）がSpyCas9のN末端に位置するように構成されたE99であり、別の例示的な融合タンパク質、E100は、RNAse1（R39D、N67D、N88A、G89D、R19D、H119N、K41R）がSpyCas9のC末端に位置するように構成されている。図6を参照されたい。

20

ベクター

【0285】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイドRNAを含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイドRNAを少なくとも1つ含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイドRNAを1つまたは複数含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイドRNAを2つまたはそれよりも多く含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示の融合タンパク質をさらに含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、第1のRNA結合性タンパク質と第2のRNA結合性タンパク質とを含む。

30

【0286】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、第1のベクターが本開示のガイドRNAを含み、第2のベクターが本開示の融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、第1のベクターは、本開示のガイドRNAを少なくとも1つ含む。一部の実施形態では、第1のベクターは、本開示のガイドRNAを1つまたは複数含む。一部の実施形態では、第1のベクターは、本開示のガイドRNAを2つまたはそれよりも多く含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、第1のRNA結合性タンパク質と第2のRNA結合性タンパク質とを含む。一部の実施形態では、第1のベクターと第2のベクターは同一である。一部の実施形態では、第1のベクターと第2のベクターは同一ではない。

40

【0287】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、ベクターは、(a)本開示のRNA標的化融合タンパク質をコードする核酸配列と、(b)標的RNA配列とハイブリダイズするまたはそれに結合するRNA配列（またはスパーサー配列）を5'末端に含み、融合タンパク質のCRISPR/Casタンパク質に結合することまたはそれと会合することができるRNA配列（または足場配列）を3'末端に含む単一ガイドRNA（sgRNA）配列とを含む「2成分RNA標的化系」の成分であるかまたはそれを含み、2成分RNA標的化系は、PAMmerの非存在下で細胞内の標的RNAを認識し、それを変更する。一部の実施形態では、2成分系の配列は、単一のベクター内に存在する。一部の実施形

50

態では、2成分系のスペーサー配列は、CUG、CCUG、CAG、およびGGGGCCからなる群から選択されるリピート配列を標的とする。

【0288】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、複製能力がない。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、単離されたものまたは組み換えられたものである。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、自己相補的である。

10

【0289】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11またはAAV12であるAAVから単離されたまたはそれに由来する末端逆位反復配列またはカプシド配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、複製能力がない。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、単離されたものまたは組み換えられたもの(rAAV)である。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、自己相補的(scAAV)である。

20

【0290】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のベクターは、非ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、ナノ粒子、ミセル、リボソームまたはリポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックスまたは dendrimer を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ベクターは、発現ベクターまたは組換え発現系である。本明細書で使用される場合、「組換え発現系」という用語は、組換えによって形成されたある特定の遺伝子材料を発現させるための遺伝子構築物を指す。

【0291】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本明細書に提示される発現ベクター、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターは、これだけに限定することなく、発現制御エレメントを含む。「発現制御エレメント」は、本明細書で使用される場合、遺伝子などのコード配列の発現を調節する任意の配列を指す。例示的な発現制御エレメントとしては、これだけに限定されないが、プロモーター、エンハンサー、マイクロRNA、転写後調節エレメント、ポリアデニル化シグナル配列、およびイントロンが挙げられる。発現制御エレメントは、例えば、構成的、誘導性、抑制性、または組織特異的であり得る。「プロモーター」は、転写の開始および速度が制御されるポリヌクレオチド配列の領域である制御配列である。プロモーターは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節性タンパク質および分子が結合することができる遺伝子エレメントを含有し得る。一部の実施形態では、プロモーターによる発現制御は、組織特異的である。非限定的な例示的なプロモーターとしては、CMV、CBA、CAG、Cbh、EF-1a、PGK、UBC、GUSB、UCOE、hAAT、TBG、デスミン、MCK、C5-12、NSE、シナプシン、PDGF、MecP2、CaMKII、mGluR2、NFL、NFH、n2、PPE、ENK、EAT2、GFAP、MBP、およびU6プロモーターが挙げられる。「エンハンサー」は、活性化タンパク質が結合して、転写の尤度または頻度を増加させることができるDNAの領域である。非限定的な例示的なエンハンサーおよび転写後調節エレメントとしては、CMVエンハンサーおよびWPREが挙げられる。

30

40

【0292】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本明細書に提示される発現ベクター、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターは、これだけに限定することなく、「マル

50

チシストロン性」または「ポリシストロン性」または「バイシストロン性」または「トリシストロン性」構築物の配置 (configuration) のための I R E S または 2 A ペプチド部位を含む、すなわち、二重もしくは三重もしくは多重のコード領域またはエクソンなどのベクターエレメントを有し、したがって、単一の構築物から、m R N A から 2 つまたはそれよりも多くのタンパク質を発現させる能力を有する。マルチシストロン性ベクターは、同じ m R N A から 2 つまたはそれよりも多くの別々のタンパク質を同時に発現させる。マルチシストロン性配置を構築するために最も広く使用されている 2 つの戦略は、I R E S または 2 A 自己切断部位を使用することである。「I R E S」は、ポリシストロニックベクター構築物に使用される、ウイルス、原核生物、または真核生物を起源とする配列内リボソーム進入部位またはその一部を指す。一部の実施形態では、I R E S は、キャップ依存的に翻訳開始を可能にする R N A エレメントである。「自己切断ペプチド」または「自己切断ペプチドをコードする配列」または「2 A 自己切断部位」という用語は、リボソームスキッピングを促進するため、したがって、単一のプロモーターから 2 つのポリペプチドを生成するための部位を組み入れるためにベクター構築物内に使用される連結配列を指す。そのような自己切断ペプチドとしては、これだけに限定することなく、T 2 A ペプチド、および P 2 A ペプチドまたは自己切断ペプチドをコードする配列が挙げられる。

【 0 2 9 3 】

一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、またはレンチウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルス/レトロウイルスキメラベクター、単純ヘルペスウイルス I もしくは I I ベクター、パルボウイルスベクター、細網内皮症ウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、乳頭腫ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、または 2 つまたはそれよりも多くのウイルスベクターの好都合な側面が組み入れられた任意のハイブリッドもしくはキメラベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、ポリヌクレオチドに作動可能に連結した 1 つまたは複数の発現制御エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、ベクターは、1 つまたは複数の選択マーカをさらに含む。一部の実施形態では、A A V ベクターは低毒性を有する。一部の実施形態では、A A V ベクターは宿主ゲノム内に組み入れられず、それにより、挿入変異誘発が引き起こされる確率が低くなる。一部の実施形態では、A A V ベクターは、4 . 5 k b から 4 . 7 5 k b までの範囲の総ポリヌクレオチドをコードし得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物、系、方法、およびキットのいずれかに使用することができる例示的な A A V ベクターとしては、A A V 1 ベクター、改変 A A V 1 ベクター、A A V 2 ベクター、改変 A A V 2 ベクター、A A V 3 ベクター、改変 A A V 3 ベクター、A A V 4 ベクター、改変 A A V 4 ベクター、A A V 5 ベクター、改変 A A V 5 ベクター、A A V 6 ベクター、改変 A A V 6 ベクター、A A V 7 ベクター、改変 A A V 7 ベクター、A A V 8 ベクター、A A V 9 ベクター、A A V . r h 1 0 ベクター、改変 A A V . r h 1 0 ベクター、A A V . r h 3 2 / 3 3 ベクター、改変 A A V . r h 3 2 / 3 3 ベクター、A A V . r h 4 3 ベクター、改変 A A V . r h 4 3 ベクター、A A V . r h 6 4 R 1 ベクター、および改変 A A V . r h 6 4 R 1 ベクターおよび任意の組合せまたはその等価物を挙げるることができる。一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、インテグラーゼコンピテントレンチウイルスベクター (I C L V) である。一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、導入遺伝子プラスミドベクターならびに関連するプラスミド (例えば、パッケージングプラスミド、r e v 発現プラスミド、エンベローププラスミド) と併せた導入遺伝子プラスミドベクターならびにウイルスまたはウイルス様侵入機構によって外因性核酸を細胞に導入することができるレンチウイルスに基づく粒子を指し得る。レンチウイルスベクターは、当技術分野で周知である (例えば、Trono D. (2002) *Lentiviral vectors*, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg および Durand et al. (2011) *Viruses* 3 (2): 132-159 doi: 10 .3390/v3020132 を参照されたい)。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物、系、方法、およびキットのいずれかに使用することができる例示的なレンチウイルスベクター

10

20

30

40

50

としては、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)1ベクター、改変ヒト免疫不全ウイルス(HIV)1ベクター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)2ベクター、改変ヒト免疫不全ウイルス(HIV)2ベクター、スーティーマンガベイスル免疫不全ウイルス(SIV_{SM})ベクター、改変スーティーマンガベイスル免疫不全ウイルス(SIV_{SM})ベクター、アフリカミドリザルサル免疫不全ウイルス(SIV_{AGM})ベクター、改変アフリカミドリザルサル免疫不全ウイルス(SIV_{AGM})ベクター、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)ベクター、改変ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)ベクター、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)ベクター、改変ネコ免疫不全ウイルス(FIV)ベクター、ビスナノマエディウイルス(VNV/VMV)ベクター、改変ビスナノマエディウイルス(VNV/VMV)ベクター、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)ベクター、改変ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)ベクター、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)、または改変ウシ免疫不全ウイルス(BIV)を挙げることができる。

10

核酸

【0294】

本明細書に記載の遺伝子移入および発現技法における使用のための、本明細書に開示される融合タンパク質をコードする核酸配列が本明細書に提示される。必ずしも明記されていないが、本明細書に提示される配列を使用して、同じ生物学的性質を有するタンパク質を生じさせる発現産物ならびに実質的に同一の配列をもたすことができることが理解されるべきである。これらの「生物学的に等価の」または「生物活性ある」または「等価の」ポリペプチドは、本明細書に記載の等価のポリヌクレオチドによってコードされる。これらは、デフォルトの条件下で実行される配列同一性方法を使用して比較した場合に、参照ポリペプチドに対して少なくとも60%、あるいは少なくとも65%、あるいは少なくとも70%、あるいは少なくとも75%、あるいは少なくとも80%、あるいは少なくとも85%、あるいは少なくとも90%、あるいは少なくとも95%あるいは少なくとも98%同一の一次アミノ酸配列を有することができる。特定の実施形態の例として特定のポリペプチド配列が提示されている。同様の電荷を有する代替のアミノ酸を用いたアミノ酸への配列の改変。さらに、等価のポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチドもしくはその相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドである、またはポリペプチドに関しては、参照コードポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドである。あるいは、等価のポリペプチドまたはタンパク質は、等価のポリヌクレオチドから発現されるものである。

20

30

【0295】

本明細書に開示される核酸配列(例えば、ポリヌクレオチド配列)は、当技術分野で周知の技法であるコドン最適化がなされたものであり得る。本明細書に開示される一部の実施形態では、例えば配列番号46(Cas13d)などの例示的なCas配列は、ヒト細胞における発現に関してコドン最適化されている。コドン最適化は、異なる細胞では特定のコドンの使用が異なるという事実を指す。このコドンの偏りは、細胞型における特定のtRNAの相対的な存在量の偏りに対応する。配列内のコドンに対応するtRNAの相対的な存在量と釣り合うように変更することにより、発現を増加させることが可能である。対応するtRNAが特定の細胞型において稀であることが分かっているコドンを故意に選択することによって発現を低減させることも可能である。哺乳動物細胞に関して、ならびに種々の他の生物体に関してコドン使用表が当技術分野で公知である。遺伝暗号に基づいて、例えばCasタンパク質をコードする核酸配列を生成することができる。一部の実施形態では、そのような配列を、例えば、Casタンパク質を発現する宿主細胞または開示されている方法が実施される細胞(例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞など)を使用するなど、宿主または標的細胞における発現に関して最適化する。特定の種についてのコドンの選好およびコドン使用表を使用して、その特定の種のコドン使用選好性(codon usage preference)を活用する、Casタンパク質をコードする単離された核酸分子(例えば、その対応する野生型タンパク質に対する少なくとも80%、少なくとも85%

40

50

、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%配列同一性を有するタンパク質をコードするものなど)を操作することができる。例えば、本明細書に開示されるCasタンパク質を、目的の特定の生物体によって優先的に使用されるコドンを含むように設計することができる。一実施例では、Cas核酸配列は、例えば、その対応する野生型または起源核酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%配列同一性を有するものなど、ヒト細胞における発現に関して最適化されたものである。一部の実施形態では、少なくとも1つのCasタンパク質(ベクターの一部であり得る)をコードする単離された核酸分子は、真核細胞における発現に関してコドン最適化された少なくとも1つのCasタンパク質コード配列、またはヒト細胞における発現に関してコドン最適化された少なくとも1つのCasタンパク質コード配列を含む。一実施形態では、そのようなコドン最適化されたCasコード配列は、その対応する野生型または起源配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%配列同一性を有する。別の実施形態では、真核細胞のコドン最適化された核酸配列は、その対応する野生型または起源タンパク質に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%配列同一性を有するCasタンパク質をコードする。別の実施形態では、配列は異なるが同じCasタンパク質配列をコードする核酸などの、機能的に等価の核酸を含有する種々のクローンを常套的に生成することができる。コード配列内のサイレント変異は、1つよりも多くのコドンが同じアミノ酸残基をコードし得る遺伝暗号の縮退(すなわち、重複性)に起因する。したがって、例えば、ロイシンはCTT、CTC、CTA、CTG、TTA、またはTTGによってコードされ得る;セリンはTCT、TCC、TCA、TCG、AGT、またはAGCによってコードされ得る;アスパラギンはAATまたはAACによってコードされ得る;アスパラギン酸はGATまたはGACによってコードされ得る;システインはTGTまたはTGCによってコードされ得る;アラニンはGCT、GCC、GCA、またはGCGによってコードされ得る;グルタミンはCAAまたはCAGによってコードされ得る;チロシンはTATまたはTACによってコードされ得る;およびイソロイシンはATT、ATC、またはATAによってコードされ得る。標準の遺伝暗号を示す表は、種々の供給源に見いだすことができる(例えば、Stryer, 1988, Biochemistry, 3rd Edition, W.H. Freeman and Co., NYを参照されたい)。

【0296】

「ハイブリダイゼーション」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対合、フーグスティーン結合、または任意の他の配列特異的様式で存在する。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、多重鎖複合体を形成する3つまたはそれよりも多くの鎖、単一の自己ハイブリダイズ鎖、またはこれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、PC反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などのより広範囲にわたるプロセスのステップを構成し得る。

【0297】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、インキュベーション温度、約25 ~ 約37 ; ハイブリダイゼーション緩衝液濃度、約6 x SSC ~ 約10 x SSC ; ホルムアミド濃度、約0% ~ 約25% ; および洗浄溶液、約4 x SSC ~ 約8 x SSCが挙げられる。中程度のハイブリダイゼーション条件の例としては、インキュベーション温度、約40 ~ 約50 ; 緩衝液濃度、約9 x SSC ~ 約2 x SSC ; ホルムアミド濃度、約30% ~ 約50% ; および洗浄溶液、約5 x SSC ~ 約2 x SSCが挙げられる。高ストリンジェンシー条件の例としては、インキュベーション温度、約55 ~ 約

10

20

30

40

50

68 ; 緩衝液濃度、約 $1 \times \text{SSC}$ ~ 約 $0.1 \times \text{SSC}$; ホルムアミド濃度、約 55% ~ 約 75% ; および洗浄溶液、約 $1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、または脱イオン水が挙げられる。一般に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は5分から24時間までであり、1回、2回、またはそれよりも多くの洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベーション時間は、約1分間、2分間、または15分間である。SSCは、 0.15 M のNaClおよび 15 mM のクエン酸緩衝液である。他の緩衝液系を使用したSSCの等価物を使用することができることが理解される。

【0298】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較のためにアラインメントすることができる各配列内の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列内の位置を同じ塩基またはアミノ酸が占めている場合、その分子は、その位置において相同である。配列間の相同性程度は、それらの配列が共有するマッチするまたは相同な位置の数に依る。「関連しない」または「非相同的」配列は、本発明の配列の1つと40%未満の同一性あるいは25%未満の同一性を共有する。

10

細胞

【0299】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の細胞は、原核細胞である。

【0300】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の細胞は、真核細胞である。一部の実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ウシ類、ネズミ類、ネコ類、ウマ類、ブタ類、イヌ類、サル類、またはヒトの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、非ヒト霊長類細胞などの非ヒト哺乳動物細胞である。

20

【0301】

一部の実施形態では、本開示の細胞は、体細胞である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、生殖細胞系列細胞である。一部の実施形態では、本開示の生殖細胞系列細胞は、ヒト細胞ではない。

【0302】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の細胞は、幹細胞である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、胚性幹細胞である。一部の実施形態では、本開示の胚性幹細胞は、ヒト細胞ではない。一部の実施形態では、本開示の細胞は、複能性幹細胞または多能性幹細胞である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、成体幹細胞である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、人工多能性幹細胞 (iPSC) である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、造血幹細胞 (HSC) である。

30

【0303】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、免疫細胞である。一部の実施形態では、本開示の免疫細胞は、リンパ球である。一部の実施形態では、本開示の免疫細胞は、Tリンパ球である (本明細書ではT細胞とも称される)。本開示の例示的なT細胞としては、これだけに限定されないが、ナイーブT細胞、エフェクターT細胞、ヘルパーT細胞、メモリーT細胞、調節性T細胞 (Treg) およびガンマデルタT細胞が挙げられる。一部の実施形態では、本開示の免疫細胞は、Bリンパ球である。一部の実施形態では、本開示の免疫細胞は、ナチュラルキラー細胞である。一部の実施形態では、本開示の免疫細胞は、抗原提示細胞である。

40

【0304】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、筋肉細胞である。一部の実施形態では、本開示の筋肉細胞は、筋芽細胞または筋細胞である。一部の実施形態では、本開示の筋肉細胞は、心筋細胞、骨格筋細胞または平滑筋細胞である。一部の実施形態では、本開示の筋肉細胞は、横紋筋細胞である。

【0305】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、上皮細胞である

50

。一部の実施形態では、本開示の上皮細胞は、扁平上皮細胞、立方上皮細胞、円柱上皮細胞、重層上皮細胞、多列円柱上皮細胞または移行上皮細胞を形成する。一部の実施形態では、本開示の上皮細胞は、これだけに限定されないが、松果体、胸腺、下垂体、甲状腺、副腎、アポクリン腺、ホロクリン腺、部分分泌腺、漿液腺、粘液腺および脂腺を含めた腺を形成する。一部の実施形態では、本開示の上皮細胞は、これだけに限定されないが、肺、脾臓、胃、膵臓、膀胱、腸、腎臓、胆嚢、肝臓、喉頭または咽頭を含めた器官の外表面と接触している。一部の実施形態では、本開示の上皮細胞は、血管または静脈の外表面と接触している。

【0306】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、神経細胞である。一部の実施形態では、本開示の神経細胞は、中枢神経系のニューロンである。一部の実施形態では、本開示の神経細胞は、脳または脊髄のニューロンである。一部の実施形態では、本開示の神経細胞は、網膜のニューロンである。一部の実施形態では、本開示の神経細胞は、脳神経または視神経のニューロンである。一部の実施形態では、本開示の神経細胞は、末梢神経系のニューロンである。一部の実施形態では、本開示の神経細胞は、神経膠細胞またはグリア細胞である。一部の実施形態では、本開示のグリア細胞は、これだけに限定されないが、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、上皮細胞、およびミクログリアを含めた、中枢神経系のグリア細胞である。一部の実施形態では、本開示のグリア細胞は、これだけに限定されないが、シュワン細胞およびサテライト細胞を含めた、末梢神経系のグリア細胞である。

10

20

【0307】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、初代細胞である。

【0308】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、培養細胞である。

【0309】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。

【0310】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、自家細胞または同種異系細胞である。

30

使用方法

【0311】

本開示は、本開示のRNA分子またはRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変する方法であって、組成物とRNA分子をガイドRNAまたは融合タンパク質（またはその一部）の1つまたは複数に結合するのに適した条件下で接触させることを含む方法を提供する。

【0312】

本開示は、RNA分子によってコードされるタンパク質の活性を改変する方法であって、組成物とRNA分子をガイドRNAまたは融合タンパク質（またはその一部）の1つまたは複数に結合するのに適した条件下で接触させることを含む方法を提供する。

40

【0313】

本開示は、本開示のRNA分子またはRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変する方法であって、組成物と、RNA分子を含む細胞を、ガイドRNAまたは融合タンパク質（またはその一部）の1つまたは複数に結合するのに適した条件下で接触させることを含む方法を提供する。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。一部の実施形態では、組成物は、本開示のガイドRNAおよび本開示の融合タンパク質を含む組

50

成物を含むベクターを含む。一部の実施形態では、ベクターは、AAVである。

【0314】

本開示は、RNA分子によってコードされるタンパク質の活性を改変する方法であって、組成物と、RNA分子を含む細胞を、ガイドRNAまたは融合タンパク質（またはその一部）の1つまたは複数がRNA分子に結合するのに適した条件下で接触させることを含む方法を提供する。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。一部の実施形態では、組成物は、本開示のガイドRNAまたは単一ガイドRNAおよび本開示の融合タンパク質を含む組成物を含むベクターを含む。一部の実施形態では、ベクターは、AAVである。

【0315】

本開示は、本開示のRNA分子またはRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変する方法であって、組成物とRNA分子をRNAヌクレアーゼ活性に適した条件下で接触させることを含み、融合タンパク質によりRNA分子の破壊が誘導される、方法を提供する。

【0316】

本開示は、RNA分子によってコードされるタンパク質の活性を改変する方法であって、組成物とRNA分子をRNAヌクレアーゼ活性に適した条件下で接触させることを含み、融合タンパク質によりRNA分子の破壊が誘導される、方法を提供する。

【0317】

本開示は、本開示のRNA分子またはRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変する方法であって、組成物と、RNA分子を含む細胞を、RNAヌクレアーゼ活性に適した条件下で接触させることを含み、融合タンパク質によりRNA分子の破壊が誘導される、方法を提供する。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。一部の実施形態では、組成物は、本開示のガイドRNAおよび本開示の融合タンパク質を含む組成物を含むベクターを含む。一部の実施形態では、ベクターは、AAVである。

【0318】

本開示は、RNA分子によってコードされるタンパク質の活性を改変する方法であって、組成物と、RNA分子を含む細胞を、RNAヌクレアーゼ活性に適した条件下で接触させることを含み、融合タンパク質によりRNA分子の破壊が誘導される、方法を提供する。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。一部の実施形態では、組成物は、本開示のガイドRNAまたは単一ガイドRNAおよび本開示の融合タンパク質を含む組成物を含むベクターを含む。一部の実施形態では、ベクターは、AAVである。

【0319】

本開示は、疾患または障害を処置する方法であって、対象に本開示の組成物を治療有効量で投与することを含む方法を提供する。

【0320】

本開示は、疾患または障害を処置する方法であって、対象に本開示の組成物を治療有効量で投与することを含み、組成物が、本開示のガイドRNAおよび本開示の融合タンパク質を含む組成物を含むベクターを含み、組成物により本開示のRNA分子またはRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルが改変される、方法を提供する。

【0321】

本開示は、疾患または障害を処置する方法であって、対象に本開示の組成物を治療有効量で投与することを含み、組成物が、本開示のガイドRNAおよび本開示の融合タンパク質を含む組成物を含むベクターを含み、組成物によりRNA分子によってコードされるタンパク質の活性が改変される、方法を提供する。

【0322】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、遺伝子疾患または障害が挙げられる。一部の実施形態では、遺

10

20

30

40

50

伝子疾患または障害は、単一遺伝子疾患または障害である。一部の実施形態では、単一遺伝子疾患または障害は、常染色体優性疾患もしくは障害、常染色体劣性疾患もしくは障害、X染色体連鎖(X連鎖)疾患もしくは障害、X連鎖優性疾患もしくは障害、X連鎖劣性疾患もしくは障害、Y連鎖疾患もしくは障害、またはミトコンドリア病もしくは障害である。一部の実施形態では、遺伝子疾患または障害は、多遺伝子疾患または障害である。一部の実施形態では、遺伝子疾患または障害は、多遺伝子疾患または障害である。一部の実施形態では、単一遺伝子疾患または障害は、これだけに限定されないが、ハンチントン病、神経線維腫症1型、神経線維腫症2型、マルファン症候群、遺伝性非ポリポーシス結腸直腸がん、遺伝性多発性外骨腫症、フォン・ヴィルブランド病、および急性間欠性ポルフィリン症を含めた常染色体優性疾患または障害である。一部の実施形態では、単一遺伝子疾患または障害は、これだけに限定されないが、白皮症、中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ欠損症、嚢胞性線維症、鎌状赤血球症、テイ・サックス病、ニーマン・ピック病、脊髄性筋萎縮症、およびロバーツ症候群を含めた常染色体劣性疾患または障害である。一部の実施形態では、単一遺伝子疾患または障害は、これだけに限定されないが、筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、血友病、副腎白質ジストロフィー(ALD)、レット症候群、および血友病Aを含めたX連鎖疾患または障害である。一部の実施形態では、単一遺伝子疾患または障害は、これだけに限定されないが、レーベル遺伝性視神経症を含めたミトコンドリア障害である。

【0323】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、免疫疾患または障害が挙げられる。一部の実施形態では、免疫疾患または障害は、これだけに限定されないが、B細胞欠損症、T細胞欠損症、好中球減少症、無脾症、補体欠損症、後天性免疫不全症候群(AIDS)および医療介入に起因する免疫不全(医学的治療の故意の作用または有害作用としての免疫抑制)を含めた免疫不全症または障害である。一部の実施形態では、免疫疾患または障害は、これだけに限定されないが、アカラシア、アジソン病、成人スチル病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、抗GBM/抗TBM腎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性血管性浮腫、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患(AIED)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性精巣炎、自己免疫性膵炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性蕁麻疹、軸索&ニューロンニューロパチー(AMAN)、パロー病、ベーチェット病、良性粘膜類天疱瘡、水疱性類天疱瘡、キャスルマン病(CD)、セリアック病、シャガス病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、慢性再発性多巣性骨髄炎(CRMO)、チャグ・ストラウス症候群(CSS)もしくは好酸性肉芽腫症(EGPA)、瘢痕性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心ブロック、コクサッキー心筋炎、CREST症候群、クローン病、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病(視神経脊髄炎)、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性食道炎(EOE)、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、本態性混合性クリオグロブリン血症、エバンス症候群、線維筋痛症、線維化肺炎、巨細胞性動脈炎(側頭動脈炎)、巨細胞心筋炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管炎性肉芽腫症、グレープス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病(HSP)、妊娠性疱疹もしくは妊娠性類天疱瘡(PG)、化膿性汗腺炎(HS)(反対型ざ瘡)、低ガンマグロブリン血症、IgA腎症、IgG4関連硬化性疾患、免疫血小板減少性紫斑病(ITP)、封入体筋炎(IBM)、間質性膀胱炎(IC)、若年性関節炎、若年性糖尿病(1型糖尿病)、若年性筋炎(JM)、川崎病、ランバート・イートン症候群、白血球破碎性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線状IgA病(LAD)、ループス、ライム病 慢性、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、混合性結合組織病(MCTD)、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多巣性運動ニューロパチー(MMN)もしくはMMNCB、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、新生児ループス、視神経脊髄炎、好中球減少症、眼部瘢痕性類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ(PR)、PANDAS、傍腫瘍性小脳変性症(PCD)

10

20

30

40

50

、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、パリー・ロンベルク症候群、毛様体扁平部炎（周辺部ぶどう膜炎）、パーソネージ・ターナー症候群、天疱瘡、末梢性ニューロパチー、静脈周囲性脳脊髄炎、悪性貧血（PA）、POEMS症候群、結節性多発性動脈炎、多腺性症候群I型、II型、III型、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、乾癬、乾癬性関節炎、赤芽球ろう（PRCA）、壊疽性膿皮症、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、再発性多発性軟骨炎、レストレスレッグス症候群（RLS）、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精子精巢自己免疫、スティッフパーソン症候群（SPS）、亜急性細菌性心内膜炎（SBE）、スザック症候群、交感性眼炎（SO）、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、血小板減少性紫斑病（TTP）、トロサ・ハント症候群（THS）、横断性脊髄炎、1型糖尿病、潰瘍性大腸炎（UC）、未分化結合組織病（UCTD）、ぶどう膜炎、血管炎、白斑、フォクト・小柳・原田病、またはヴェグナー肉芽腫症を含めた自己免疫疾患または障害である。

【0324】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、炎症性疾患または障害が挙げられる。

【0325】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、代謝性疾患または障害が挙げられる。

【0326】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、変性または進行性疾患または障害が挙げられる。一部の実施形態では、変性または進行性疾患または障害として、これだけに限定されないが、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病、アルツハイマー病、および老化が挙げられる。

【0327】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、感染性疾患または障害が挙げられる。

【0328】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、小児もしくは発達疾患または障害が挙げられる。

【0329】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、循環器の疾患または障害が挙げられる。

【0330】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害として、これだけに限定されないが、増殖性疾患または障害が挙げられる。一部の実施形態では、増殖性疾患または障害は、がんである。一部の実施形態では、がんとして、これだけに限定されないが、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、副腎皮質癌、AIDS関連がん、カポジ肉腫（軟部組織肉腫）、AIDS関連リンパ腫（リンパ腫）、CNS原発リンパ腫（リンパ腫）、肛門がん、虫垂がん、消化管カルチノイド腫瘍、星状細胞腫、非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、中枢神経系（脳がん）、基底細胞癌、胆管がん、膀胱がん、骨がん、ユーイング肉腫、骨肉腫、悪性線維性組織球腫、脳腫瘍、乳がん、パーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、癌、心臓（Cardiac）（心臓（Heart））腫瘍、胚芽腫、胚細胞性腫瘍、CNS原発リンパ腫、子宮頸がん、胆管癌、脊索腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄増殖性新生物、結腸直腸がん、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、非浸潤性乳管癌、胚芽腫、子宮体がん（子宮がん）、上衣腫、食道がん、鼻腔神経芽細胞腫（頭頸部がん）、ユーイング肉腫（骨がん）、頭蓋外胚細胞性腫瘍、性腺外胚細胞性腫瘍、眼がん、小児期眼内黒色腫、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫、卵管がん、骨の悪性線維性組織球腫、および骨肉

10

20

30

40

50

腫、胆嚢がん、胃 (g a s t r i c) (胃 (s t o m a c h)) がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍 (G I S T) (軟部組織肉腫)、小児期消化管間質腫瘍、胚細胞性腫瘍、小児期頭蓋外胚細胞性腫瘍、性腺外胚細胞性腫瘍、卵巣胚細胞性腫瘍、精巣がん、妊娠性絨毛疾患、ヘアリー細胞白血病、頭頸部がん、心臓腫瘍、肝細胞 (肝臓) がん、組織球増殖症、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん (頭頸部がん)、眼内黒色腫、腓島細胞腫瘍、腓臓神経内分泌腫瘍、カボジ肉腫 (軟部組織肉腫)、腎臓 (腎細胞) がん、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、喉頭がん (頭頸部がん)、白血病、口唇・口腔がん (頭頸部がん)、肝がん、肺がん (非小細胞および小細胞)、小児期肺がん、リンパ腫、男性乳がん、骨の悪性線維性組織球腫および骨肉腫、黒色腫、メルケル細胞癌 (皮膚がん)、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮性頸部がん (頭頸部がん)、NUT遺伝子の変化を伴う正中線癌、口のがん (Mouth Cancer) (頭頸部がん)、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫 / 形質細胞新生物、菌状息肉腫 (リンパ腫)、骨髄異形成症候群、骨髄異形成 / 骨髄増殖性新生物、鼻腔・副鼻腔がん (頭頸部がん)、鼻咽頭がん (頭頸部がん)、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺がん、口のがん (Oral Cancer)、口唇・口腔がんおよび中咽頭がん、骨肉腫および骨の悪性線維性組織球腫、卵巣がん、腓がん、腓臓神経内分泌腫瘍 (腓島細胞腫瘍)、乳頭腫症、傍神経節腫、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん (頭頸部がん)、褐色細胞腫、形質細胞新生物 / 多発性骨髄腫、胸膜肺芽腫、妊娠期乳がん、中枢神経系 (C N S) 原発リンパ腫、原発性腹膜がん、前立腺がん、直腸がん、再発性がん、腎細胞 (腎臓) がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、小児期 (軟部組織肉腫)、唾液腺がん (頭頸部がん)、肉腫、小児期横紋筋肉腫 (軟部組織肉腫)、小児期血管腫瘍 (軟部組織肉腫)、ユーイング肉腫 (骨がん)、カボジ肉腫 (軟部組織肉腫)、骨肉腫 (骨がん)、子宮肉腫、セザリー症候群、リンパ腫、皮膚がん、小細胞肺がん、小腸がん、軟部組織肉腫、皮膚の扁平上皮癌、扁平上皮性頸部がん、胃 (s t o m a c h) (胃 (g a s t r i c)) がん、T細胞リンパ腫、精巣がん、咽喉がん (頭頸部がん)、鼻咽頭がん、中咽頭がん、下咽頭がん、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺がん、腎盂および尿管の移行上皮がん、腎細胞がん、尿道がん、子宮肉腫、膣がん、血管腫瘍 (軟部組織肉腫)、外陰がん、ウィルムス腫瘍ならびに他の小児期腎腫瘍が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 3 3 1 】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、疾患または障害の診断を受けている。一部の実施形態では、本開示の対象は、疾患または障害の徴候または症状を少なくとも1つ示している。一部の実施形態では、対象は、疾患または障害が発生するリスクが予測されるバイオマーカーを有する。一部の実施形態では、バイオマーカーは、遺伝子変異である。

【 0 3 3 2 】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、女性である。本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、男性である。一部の実施形態では、本開示の対象は、2つの染色体XXまたはXYを有する。一部の実施形態では、本開示の対象は、2つの染色体XXまたはXYおよび第3の染色体、XまたはYのいずれかを有する。

【 0 3 3 3 】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、新生児、乳児、小児、成人、年配成人、または高齢成人である。本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、少なくとも1日齢、2日齢、3日齢、4日齢、5日齢、6日齢、7日齢、8日齢、9日齢、10日齢、11日齢、12日齢、13日齢、14日齢、15日齢、16日齢、17日齢、18日齢、19日齢、20日齢、21日齢、22日齢、23日齢、24日齢、25日齢、26日齢、27日齢、28日齢、29日齢、30日齢または31日齢である。本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、少なくとも1カ月齢、2カ月齢、3カ月齢、4カ月齢、5カ月齢、6カ月齢、7カ月齢、8カ月齢、9カ月齢、10カ月齢、11カ月齢または12カ月齢である。本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、少なくとも1歳、2歳、3歳、4歳、5歳、6歳、7歳、8歳、9歳、10歳、15歳、20歳、25歳、30歳、35歳、40歳、45歳、50歳、55歳、60歳、65歳、7

0歳、75歳、80歳、85歳、90歳、95歳、100歳またはその間の任意の年齢または部分年齢である。

【0334】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、哺乳動物である。一部の実施形態では、本開示の対象は、非ヒト哺乳動物である。

【0335】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、ヒトである。

【0336】

本開示の方法の一部の実施形態では、治療有効量は、単回用量の本開示の組成物を含む。一部の実施形態では、治療有効量は、少なくとも1用量の本開示の組成物を含む。一部の実施形態では、治療有効量は、1用量または複数用量の本開示の組成物を含む。

10

【0337】

本開示の方法の一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害の徴候または症状を排除するものである。一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害の徴候または症状の重症度を低下させるものである。

【0338】

本開示の方法の一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害を排除するものである。

【0339】

本開示の方法の一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害の発症を防止するものである。一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害の発症を遅延させるものである。一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害の徴候または症状の重症度を低下させるものである。一部の実施形態では、治療有効量は、対象の予後を改善するものである。

20

【0340】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の組成物は、対象に全身的に投与される。一部の実施形態では、本開示の組成物は、対象に静脈内経路によって投与される。一部の実施形態では、本開示の組成物は、対象に注射または注入によって投与される。

【0341】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の組成物は、対象に局所的に投与される。一部の実施形態では、本開示の組成物は、対象に骨内、眼内、脳脊髄内または脊髄内経路によって投与される。一部の実施形態では、本開示の組成物は、中枢神経系の脳脊髄液に直接投与される。一部の実施形態では、本開示の組成物は、眼の組織または流体に直接投与され、眼構造の外側では生物学的利用能を有さない。一部の実施形態では、本開示の組成物は、対象に注射または注入によって投与される。

30

【0342】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるRNA結合性融合タンパク質を含む組成物を医薬組成物として製剤化する。簡単に述べると、本明細書に開示される使用のための医薬組成物は、必要に応じて免疫直交性でもある、融合タンパク質（複数可）または必要に応じてAAV内に含まれた融合タンパク質（複数可）をコードするポリヌクレオチドを、1つまたは複数の薬学的にまたは生理的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて含み得る。そのような組成物は、緩衝液、例えば、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水など；炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはアミノ酸、例えば、グリシン；抗酸化剤；キレート剤、例えば、EDTAまたはグルタチオン；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存剤を含み得る。本開示の組成物は、経口投与、静脈内投与、局部投与、経腸投与、眼内投与、および/または非経口投与用に製剤化することができる。ある特定の実施形態では、本開示の組成物を静脈内投与用に製剤化する。

40

実施形態例：

【0343】

50

実施形態 1 .

(a) R N A 分子内の標的配列に特異的に結合するガイド R N A (g R N A) を含む配列と、

(b) 第 1 の R N A 結合性ポリペプチドをコードする配列と第 2 の R N A 結合性ポリペプチドをコードする配列とを含む、融合タンパク質をコードする配列とを含む組成物であって、

第 1 の R N A 結合性ポリペプチドも第 2 の R N A 結合性ポリペプチドも有意な D N A ヌクレアーゼ活性を含まず、

第 1 の R N A 結合性ポリペプチドと第 2 の R N A 結合性ポリペプチドが同一ではなく、かつ

第 2 の R N A 結合性ポリペプチドが、R N A ヌクレアーゼ活性を含む、組成物

または

第 1 の R N A 結合性ポリペプチドと第 2 の R N A 結合性ポリペプチドとを含む融合タンパク質をコードする核酸配列を含む組成物であって、第 1 の R N A 結合性ポリペプチドが、ガイドされる R N A 結合性ポリペプチドではなく、第 1 の R N A 結合性ポリペプチドと第 2 の R N A 結合性ポリペプチドが同一ではなく、かつ第 2 の R N A 結合性ポリペプチドが、R N A ヌクレアーゼ活性を含む、組成物。

実施形態 2 . 標的配列が、少なくとも 1 つのリピート配列を含む、実施形態 1 に記載の組成物。

実施形態 3 . g R N A を含む配列が、g R N A を真核細胞において発現させることができるプロモーターを含む、実施形態 1 または 2 に記載の組成物。

実施形態 4 . 真核細胞が、動物細胞である、実施形態 3 に記載の組成物。

実施形態 5 . 動物細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態 4 に記載の組成物。

実施形態 6 . 動物細胞が、ヒト細胞である、実施形態 5 に記載の組成物。

実施形態 7 . プロモーターが、構成的に活性なプロモーターである、実施形態 1 から 6 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 8 . プロモーターが、R N A ポリメラーゼの発現を駆動することができるプロモーターから単離されるまたはそれに由来する、実施形態 1 から 7 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 9 . プロモーターが、U 6 プロモーターから単離されるまたはそれに由来する、実施形態 8 に記載の組成物。

実施形態 1 0 . プロモーターが、転移 R N A (t R N A) の発現を駆動することができるプロモーターから単離されるまたはそれに由来する、実施形態 1 から 7 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 1 1 . プロモーターが、アラニン t R N A プロモーター、アルギニン t R N A プロモーター、アスパラギン t R N A プロモーター、アスパラギン酸 t R N A プロモーター、システイン t R N A プロモーター、グルタミン t R N A プロモーター、グルタミン酸 t R N A プロモーター、グリシン t R N A プロモーター、ヒスチジン t R N A プロモーター、イソロイシン t R N A プロモーター、ロイシン t R N A プロモーター、リシン t R N A プロモーター、メチオニン t R N A プロモーター、フェニルアラニン t R N A プロモーター、プロリン t R N A プロモーター、セリン t R N A プロモーター、トレオニン t R N A プロモーター、トリプトファン t R N A プロモーター、チロシン t R N A プロモーター、またはバリン t R N A プロモーターから単離されるまたはそれに由来する、実施形態 1 0 に記載の組成物。

実施形態 1 2 . プロモーターが、バリン t R N A プロモーターから単離されるまたはそれに由来する、実施形態 1 0 に記載の組成物。

実施形態 1 3 . g R N A を含む配列が、標的 R N A 配列に特異的に結合するスパーサー配列を含む、実施形態 1 から 1 2 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 1 4 . スパーサー配列が、標的 R N A 配列に対して少なくとも 5 0 %、5 5 %

10

20

30

40

50

、60%、65%、70%、75%、80%、87%、90%、95%、97%、99%
またはその間の任意のパーセンテージの相補性を有する、実施形態13に記載の組成物。

実施形態15．スパーサー配列が、標的RNA配列に対して100%の相補性を有する、実施形態13に記載の組成物。

実施形態16．スパーサー配列が、20ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、実施形態13から15のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態17．スパーサー配列が、21ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、実施形態13から15のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態18．スパーサー配列が、配列

【化146】

UGGAGCGAGCAUCCCCAAA (配列番号 1),
GUUUGGGGGAUGCUCGCUCCA (配列番号 2), CCCUCACUGCUGGGGAGUCC (配列
番号 3), GGACUCCCCAGCAGUGAGGG (配列番号 4),
GCAACUGGAUCAAUUUGCUG (配列番号 5), GCAGCAAUUGAUCCAGUUGC (配列
番号 6), GCAUUCUUAUCUGGUCAGUGC (配列番号 7),
GCACUGACCAGAUAAAGAAUG (配列番号 8), GAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG (配列
番号 9), GCAGGCAGGCAGGCAGGCAGG (配列番号 10),
GCCCCGGCCCCGGCCCCGGC (配列番号 11), or GCTGCTGCTGCTGCTGCTGC (配列
番号 12), GGGGCCGGGGCCGGGGCCGG (配列番号 74),
GGGCCGGGGCCGGGGCCGGG (配列番号 75), GGCCGGGGCCGGGGCCGGGG (配列
番号 76), GCCGGGGCCGGGGCCGGGGC (配列番号 77),
CCGGGGCCGGGGCCGGGGCC (配列番号 78), CGGGGCCGGGGCCGGGGCCG (配列
番号 79)

を含む、実施形態17に記載の組成物。

実施形態19．gRNAを含む配列が、第1のRNA結合性タンパク質に特異的に結合する足場配列を含む、実施形態1から18のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態20．足場配列が、ステムループ構造を含む、実施形態19に記載の組成物。

実施形態21．足場配列が、90ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、実施形態19または20に記載の組成物。

実施形態22．足場配列が、93ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、実施形態19または20に記載の組成物。

実施形態23．足場配列が、配列

【化147】

GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUU
AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (配列番号 13)

を含む、実施形態22に記載の組成物。

実施形態24．スパーサー配列が、配列

【化148】

GUGAUAAAGUGGAAUGCCAUG (配列番号 14),
CUGGUGAACUCCGAUAGUG (配列番号 15), または GAGATATAGCCTGGTGGTTC
(配列番号 16)

10

20

30

40

50

を含む、実施形態 16 に記載の組成物。

実施形態 25 . 足場配列が、ステップ - ループ構造を含む、実施形態 19 または 24 に記載の組成物。

実施形態 26 . 足場配列が、85ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、実施形態 25 に記載の組成物。

実施形態 27 . 足場配列が、配列
【化 149】

GGACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCUUUUUU (配列番号 17)

10

を含む、実施形態 26 に記載の組成物。

実施形態 28 . スペーサー配列が、配列 C U G (配列番号 18)、C C U G (配列番号 19)、C A G (配列番号 80)、G G G G C C (配列番号 81) またはこれらの任意の組合せの少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、または 7 つのリピートの配列を含む、実施形態 16 に記載の組成物。

実施形態 29 . gRNA を含む配列が、第 1 の RNA 結合性タンパク質に特異的に結合する足場配列を含む、実施形態 28 に記載の組成物。

実施形態 30 . 足場配列が、ステムループ構造を含む、実施形態 29 に記載の組成物。

実施形態 31 . 足場配列が、90ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、実施形態 29 または 30 に記載の組成物。

20

実施形態 32 . 足場配列が、93ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、実施形態 30 または 31 に記載の組成物。

実施形態 33 . 足場配列が、配列

【化 150】

GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU
AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (配列番号 82) または
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (配列番号 83)

を含む、実施形態 32 に記載の組成物。

実施形態 34 . gRNA が、RNA 分子内の第 2 の配列に結合しないまたは選択的には結合しない、実施形態 1 から 33 のいずれか 1 つに記載の組成物。

30

実施形態 35 . RNA ゲノムまたは RNA トランスクリプトームが、RNA 分子を含む、実施形態 34 に記載の組成物。

実施形態 36 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、C R I S P R - C a s タンパク質を含む、実施形態 1 から 35 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 37 . C R I S P R - C a s タンパク質が、I I 型 C R I S P R - C a s タンパク質である、実施形態 36 に記載の組成物。

実施形態 38 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、C a s 9 ポリペプチドまたはその RNA 結合性部分を含む、実施形態 37 に記載の組成物。

実施形態 39 . C R I S P R - C a s タンパク質が、V 型 C R I S P R - C a s タンパク質である、実施形態 36 に記載の組成物。

40

実施形態 40 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、C p f 1 ポリペプチドまたはその RNA 結合性部分を含む、実施形態 39 に記載の組成物。

実施形態 41 . C R I S P R - C a s タンパク質が、V I 型 C R I S P R - C a s タンパク質である、実施形態 36 に記載の組成物。

実施形態 42 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、C a s 13 ポリペプチドまたはその RNA 結合性部分を含む、実施形態 41 に記載の組成物。

実施形態 43 . C R I S P R - C a s タンパク質が、ネイティブな RNA ヌクレアーゼ活性を含む、実施形態 36 から 42 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 44 . ネイティブな RNA ヌクレアーゼ活性が低下しているまたは阻害されて

50

いる、実施形態 43 に記載の組成物。

実施形態 45 . ネイティブな RNAヌクレアーゼ活性が増加しているまたは誘導されている、実施形態 43 に記載の組成物。

実施形態 46 . CRISPR - Cas タンパク質が、ネイティブな DNAヌクレアーゼ活性を含み、ネイティブな DNAヌクレアーゼ活性が阻害されている、実施形態 36 から 45 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 47 . CRISPR - Cas タンパク質が変異を含む、実施形態 46 に記載の組成物。

実施形態 48 . CRISPR - Cas タンパク質のヌクレアーゼドメインが、変異を含む、実施形態 47 に記載の組成物。

実施形態 49 . 変異が、CRISPR - Cas タンパク質をコードする核酸に存在する、実施形態 47 に記載の組成物。

実施形態 50 . 変異が、CRISPR - Cas タンパク質をコードするアミノ酸に存在する、実施形態 47 に記載の組成物。

実施形態 51 . 変異が、置換、挿入、欠失、フレームシフト、逆位、または転位を含む、実施形態 47 から 50 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 52 . 変異が、ヌクレアーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン内の結合性部位、ヌクレアーゼドメイン内の活性部位、またはヌクレアーゼドメイン内の少なくとも 1 つの必須アミノ酸残基の欠失を含む、実施形態 47 から 50 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 53 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、Pumilio および FBF (PUF) タンパク質を含む、実施形態 1 から 35 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 54 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、Pumilio に基づくアセンブリ (PUMBY) タンパク質を含む、実施形態 53 に記載の組成物。

実施形態 55 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、RNA 結合活性のために多量体形成を必要としない、実施形態 1 から 54 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 56 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、多量体複合体の単量体ではない、実施形態 55 に記載の組成物。

実施形態 57 . 多量体タンパク質複合体が、第 1 の RNA 結合性タンパク質を含まない、実施形態 55 に記載の組成物。

実施形態 58 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、RNA 分子内の標的配列に選択的に結合する、実施形態 1 から 57 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 59 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、RNA 分子内の第 2 の配列に対する親和性を含まない、実施形態 58 に記載の組成物。

実施形態 60 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、RNA 分子内の第 2 の配列に対して高い親和性を含まずそれに選択的に結合しない、実施形態 58 または 59 に記載の組成物。

実施形態 61 . RNA ゲノムまたは RNA トランスクリプトームが、RNA 分子を含む、実施形態 60 に記載の組成物。

実施形態 62 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、終点を含めて、2 アミノ酸から 1300 アミノ酸の間を含む、実施形態 1 から 61 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 63 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質をコードする配列が、核局在化シグナル (NLS) をコードする配列をさらに含む、実施形態 1 から 62 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 64 . 核局在化シグナル (NLS) をコードする配列が、第 1 の RNA 結合性タンパク質をコードする配列に対して 3' 側に位置する、実施形態 63 に記載の組成物。

実施形態 65 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質が、C 末端に NLS を含む、実施形態 64 に記載の組成物。

実施形態 66 . 第 1 の RNA 結合性タンパク質をコードする配列が、第 1 の NLS をコードする第 1 の配列および第 2 の NLS をコードする第 2 の配列をさらに含む、実施形態

10

20

30

40

50

1 から 6 2 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 6 7 . 第 1 の N L S をコードする配列または第 2 の N L S をコードする配列が、第 1 の R N A 結合性タンパク質をコードする配列に対して 3 ' 側に位置する、実施形態 6 6 に記載の組成物。

実施形態 6 8 . 第 1 の R N A 結合性タンパク質が、C 末端に第 1 の N L S または第 2 の N L S を含む、実施形態 6 7 に記載の組成物。

実施形態 6 9 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、ヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる、実施形態 1 から 6 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 7 0 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質をコードする配列が、R N A s e を含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 7 1 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e 1 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 7 2 . R N A s e 1 タンパク質が、配列番号 2 0 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 1 に記載の組成物。

実施形態 7 3 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e 4 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 2 に記載の組成物。

実施形態 7 4 . R N A s e 4 タンパク質が、(配列番号 2 1 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 3 に記載の組成物。

実施形態 7 5 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e 6 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 7 6 . R N A s e 6 タンパク質が、配列番号 2 2 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 5 に記載の組成物。

実施形態 7 7 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e 7 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 7 8 . R N A s e 7 タンパク質が、配列番号 2 3 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 7 に記載の組成物。

実施形態 7 9 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e 8 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 8 0 . R N A s e 8 タンパク質が、配列番号 2 4 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 9 に記載の組成物。

実施形態 8 1 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e 2 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 8 2 . R N A s e 2 タンパク質が、配列番号 2 5 を含むまたはそれからなる、実施形態 8 1 に記載の組成物。

実施形態 8 3 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e 6 P L を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 8 4 . R N A s e 6 P L タンパク質が、配列番号 2 6 を含むまたはそれからなる、実施形態 8 3 に記載の組成物。

実施形態 8 5 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e L を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 8 6 . R N A s e L タンパク質が、配列番号 2 7 を含むまたはそれからなる、実施形態 8 5 に記載の組成物。

実施形態 8 7 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e T 2 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 8 8 . R N A s e T 2 タンパク質が、配列番号 2 8 を含むまたはそれからなる、実施形態 8 7 に記載の組成物。

実施形態 8 9 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、R N A s e 1 1 を含むまたはそれからなる、実施形態 7 0 に記載の組成物。

実施形態 9 0 . R N A s e 1 1 が、配列番号 2 9 を含むまたはそれからなる、実施形態 8 9 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 91 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、RNAse T2 様を含むまたはそれからなる、実施形態 70 に記載の組成物。

実施形態 92 . RNAse T2 様タンパク質が、配列番号 30 を含むまたはそれからなる、実施形態 91 に記載の組成物。

実施形態 93 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、NOB1 ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 69 に記載の組成物。

実施形態 94 . NOB1 ポリペプチドが、配列番号 31 を含むまたはそれからなる、実施形態 93 に記載の組成物。

実施形態 95 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、エンドヌクレアーゼを含むまたはそれからなる、実施形態 69 に記載の組成物。

実施形態 96 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、エンドヌクレアーゼ V (ENDOV) を含むまたはそれからなる、実施形態 95 に記載の組成物。

実施形態 97 . ENDOV タンパク質が、配列番号 32 を含むまたはそれからなる、実施形態 96 に記載の組成物。

実施形態 98 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、エンドヌクレアーゼ G (ENDOG) を含むまたはそれからなる、実施形態 95 に記載の組成物。

実施形態 99 . ENDOG タンパク質が、配列番号 33 を含むまたはそれからなる、実施形態 98 に記載の組成物。

実施形態 100 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、エンドヌクレアーゼ D1 (ENDO D1) を含むまたはそれからなる、実施形態 95 に記載の組成物。

実施形態 101 . ENDO D1 タンパク質が、配列番号 34 を含むまたはそれからなる、実施形態 100 に記載の組成物。

実施形態 102 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、ヒトフラップエンドヌクレアーゼ - 1 (hFEN1) を含むまたはそれからなる、実施形態 95 に記載の組成物。

実施形態 103 . hFEN1 タンパク質が、配列番号 35 を含むまたはそれからなる、実施形態 102 に記載の組成物。

実施形態 104 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、ヒト Schlafen14 (hSLFN14) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 69 に記載の組成物。

実施形態 105 . hSLFN14 ポリペプチドが、配列番号 36 を含むまたはそれからなる、実施形態 104 に記載の組成物。

実施形態 106 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、ヒトベータ - ラクタマーゼ様タンパク質 2 (hLACTB2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 69 に記載の組成物。

実施形態 107 . hLACTB2 ポリペプチドが、配列番号 37 を含むまたはそれからなる、実施形態 106 に記載の組成物。

実施形態 108 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、脱プリン / 脱ピリミジン (AP) エンドデオキシリボヌクレアーゼ (APEX2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 69 に記載の組成物。

実施形態 109 . APEX2 ポリペプチドが、配列番号 38 を含むまたはそれからなる、実施形態 108 に記載の組成物。

実施形態 110 . APEX2 ポリペプチドが、配列番号 39 を含むまたはそれからなる、実施形態 108 に記載の組成物。

実施形態 111 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、アンジオゲニン (ANG) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 69 に記載の組成物。

実施形態 112 . ANG ポリペプチドが、配列番号 40 を含むまたはそれからなる、実施形態 111 に記載の組成物。

実施形態 113 . 第 2 の RNA 結合性タンパク質が、熱応答性タンパク質 12 (HRS P12) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 69 に記載の組成物。

実施形態 114 . HRS P12 ポリペプチドが、配列番号 41 を含むまたはそれからなる、実施形態 113 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 115 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、ジンクフィンガー C C C H 型含有 1 2 A (Z C 3 H 1 2 A) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 116 . Z C 3 H 1 2 A ポリペプチドが、配列番号 4 2 を含むまたはそれからなる、実施形態 115 に記載の組成物。

実施形態 117 . Z C 3 H 1 2 A ポリペプチドが、配列番号 4 3 を含むまたはそれからなる、実施形態 115 に記載の組成物。

実施形態 118 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、反応性中間体イミンデアミナーゼ A (R I D A) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 119 . R I D A ポリペプチドが、配列番号 4 4 を含むまたはそれからなる、実施形態 118 に記載の組成物。

実施形態 120 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、ホスホリパーゼ D ファミリーメンバー 6 (P D L 6) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 121 . P D L 6 ポリペプチドが、(配列番号 1 2 6 を含むまたはそれからなる、実施形態 120 に記載の組成物。

実施形態 122 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、エンドヌクレアーゼ I I I 様タンパク質 1 (N T H L) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 123 . N T H L ポリペプチドが、配列番号 1 2 3 を含むまたはそれからなる、実施形態 122 に記載の組成物。

実施形態 124 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、ミトコンドリアリボヌクレアーゼ P 触媒サブユニット (K I A A 0 3 9 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 125 . K I A A 0 3 9 1 ポリペプチドが、配列番号 1 2 7 を含むまたはそれからなる、実施形態 124 に記載の組成物。

実施形態 126 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、脱プリンまたは脱ピリミジン部位リアーゼ (A P E X 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 127 . A P E X 1 ポリペプチドが、配列番号 1 2 5 を含むまたはそれからなる、実施形態 126 に記載の組成物。

実施形態 128 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、アルゴノート 2 (A G O 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 129 . A G O 2 ポリペプチドが、配列番号 1 2 8 を含むまたはそれからなる、実施形態 128 に記載の組成物。

実施形態 130 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、ミトコンドリアヌクレアーゼ E X O G (E X O G) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 131 . E X O G ポリペプチドが、配列番号 1 2 9 を含むまたはそれからなる、実施形態 130 に記載の組成物。

実施形態 132 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、ジンクフィンガー C C C H 型含有 1 2 D (Z C 3 H 1 2 D) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 133 . Z C 3 H 1 2 D ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 を含むまたはそれからなる、実施形態 132 に記載の組成物。

実施形態 134 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、小胞体から核へのシグナル伝達 2 (E R N 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 135 . E R N 2 ポリペプチドが、配列番号 1 3 1 を含むまたはそれからなる、実施形態 134 に記載の組成物。

実施形態 136 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、ペロタ m R N A サーベイランスお

10

20

30

40

50

よびリボソームレスキュー因子 (P E L O) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 3 7 . P E L O ポリペプチドが、配列番号 1 3 2 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 3 6 に記載の組成物。

実施形態 1 3 8 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、 Y B E Y メタロペプチダーゼ (Y B E Y) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 3 9 . Y B E Y ポリペプチドが、配列番号 1 3 3 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 3 8 に記載の組成物。

実施形態 1 4 0 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、切断およびポリアデニル化特異的因子 4 様 (C P S F 4 L) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 4 1 . C P S F 4 L が、配列番号 1 3 4 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 4 0 に記載の組成物。

実施形態 1 4 2 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、 h C G _ 2 0 0 2 7 3 1 ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 4 3 . h C G _ 2 0 0 2 7 3 1 ポリペプチドが、配列番号 1 3 5 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 4 2 に記載の組成物。

実施形態 1 4 4 . h C G _ 2 0 0 2 7 3 1 ポリペプチドが、配列番号 1 3 6 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 4 2 に記載の組成物。

実施形態 1 4 5 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、除去修復交差相補群 1 (E R C C 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 4 6 . E R C C 1 ポリペプチドが、配列番号 1 3 7 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 4 5 に記載の組成物。

実施形態 1 4 7 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、 r a s 関連 C 3 ボツリヌス毒素基質 1 アイソフォーム (R A C 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 4 8 . R A C 1 ポリペプチドが、配列番号 1 3 8 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 4 7 に記載の組成物。

実施形態 1 4 9 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、リボヌクレアーゼ A A 1 (R A A 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 5 0 . R A A 1 ポリペプチドが、配列番号 1 3 9 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 4 9 に記載の組成物。

実施形態 1 5 1 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、 R a s 関連タンパク質 (R A B 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 5 2 . R A B 1 ポリペプチドが、配列番号 1 4 0 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 5 1 に記載の組成物。

実施形態 1 5 3 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、 D N A 複製ヘリカーゼ / ヌクレアーゼ 2 (D N A 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 5 4 . D N A 2 ポリペプチドが、配列番号 1 4 1 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 5 3 に記載の組成物。

実施形態 1 5 5 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、 F L J 3 5 2 2 0 ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 5 6 . F L J 3 5 2 2 0 ポリペプチドが、配列番号 1 4 2 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 5 5 に記載の組成物。

実施形態 1 5 7 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、 F L J 1 3 1 7 3 ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 5 8 . F L J 1 3 1 7 3 ポリペプチドが、 (配列番号 1 4 3 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 5 7 に記載の組成物。

実施形態 1 5 9 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、 D N A 修復エンドヌクレアーゼ X

10

20

30

40

50

P F (E R C C 4) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 6 0 . E R C C 4 ポリペプチドが、配列番号 6 4 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 5 9 に記載の組成物。

実施形態 1 6 1 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 6 2 . R n a s e 1 (K 4 1 R) ポリペプチドが、配列番号 1 1 6 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 6 1 に記載の組成物。

実施形態 1 6 3 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R 、 D 1 2 1 E)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 6 4 . R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R 、 D 1 2 1 E)) ポリペプチドが、配列番号 1 1 7 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 6 3 に記載の組成物。

実施形態 1 6 5 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R 、 D 1 2 1 E 、 H 1 1 9 N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 6 6 . R n a s e 1 (R n a s e 1 (K 4 1 R 、 D 1 2 1 E 、 H 1 1 9 N)) ポリペプチドが、配列番号 1 1 8 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 6 5 に記載の組成物。

実施形態 1 6 7 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (H 1 1 9 N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 6 8 . R n a s e 1 (R n a s e 1 (H 1 1 9 N)) ポリペプチドが、配列番号 1 1 9 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 6 7 に記載の組成物。

実施形態 1 6 9 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (R 3 9 D 、 N 6 7 D 、 N 8 8 A 、 G 8 9 D 、 R 9 1 D 、 H 1 1 9 N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 7 0 . R n a s e 1 (R n a s e 1 (R 3 9 D 、 N 6 7 D 、 N 8 8 A 、 G 8 9 D 、 R 9 1 D 、 H 1 1 9 N)) ポリペプチドが、配列番号 1 2 0 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 7 1 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (R 3 9 D 、 N 6 7 D 、 N 8 8 A 、 G 8 9 D 、 R 9 1 D 、 H 1 1 9 N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 7 2 . R n a s e 1 (R n a s e 1 (R 3 9 D 、 N 6 7 D 、 N 8 8 A 、 G 8 9 D 、 R 9 1 D 、 H 1 1 9 N 、 K 4 1 R 、 D 1 2 1 E)) ポリペプチドが、配列番号 1 2 1 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 7 1 に記載の組成物。

実施形態 1 7 3 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、変異型 R n a s e 1 (R n a s e 1 (R 3 9 D 、 N 6 7 D 、 N 8 8 A 、 G 8 9 D 、 R 9 1 D 、 H 1 1 9 N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 7 4 . R n a s e 1 (R n a s e 1 (R 3 9 D 、 N 6 7 D 、 N 8 8 A 、 G 8 9 D 、 R 9 1 D)) ポリペプチドが、配列番号 1 2 2 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 7 3 に記載の組成物。

実施形態 1 7 5 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、テニユーリン膜貫通タンパク質 1 (T E N M 1) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 7 6 . T E N M 1 ポリペプチドが、配列番号 1 4 4 を含むまたはそれからなる、実施形態 1 7 5 に記載の組成物。

実施形態 1 7 7 . 第 2 の R N A 結合性タンパク質が、テニユーリン膜貫通タンパク質 2 (T E N M 2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる、実施形態 6 9 に記載の組成物。

実施形態 1 7 8 . T E N M 2 ポリペプチドが、配列番号 1 4 5 を含むまたはそれからなる

10

20

30

40

50

る、実施形態 177 に記載の組成物。

実施形態 179 . (a) 第 1 の RNA 結合性ポリペプチドをコードする配列またはその一部と、(b) 第 2 の RNA 結合性ポリペプチドをコードする配列とを含む標的 RNA 結合性融合タンパク質をコードする配列を含む組成物であって、第 1 の RNA 結合性ポリペプチドが、g RNA 配列によってガイドされていない標的 RNA に結合し、第 2 の RNA 結合性ポリペプチドが、RNA ヌクレアーゼ活性を含む、組成物。

実施形態 180 . 第 1 の RNA 結合性ポリペプチドまたはその一部が、PUF、PUMB Y、または PPR ポリペプチド、またはその一部である、実施形態 179 に記載の組成物。

実施形態 181 . RNA 分子または RNA 分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変するための方法であって、実施形態 1 または 179 に記載の組成物と RNA 分子を、融合タンパク質またはその一部の RNA 分子への結合に適した条件下で接触させることを含む方法。

10

【実施例】

【0344】

(実施例 1)

方法

HEK - 293 細胞を、10% FBS および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (G I B C O) を伴う D M E M 中で培養し、90% ~ 100% の集密度で継代した。細胞を、RNA 単離のために 24 ウェルプレートのウェル当たり細胞 1×10^5 個で播種したか、またはルシフェラーゼアッセイのために 96 ウェルプレートのウェル当たり細胞 0.5×10^5 個で播種した。RNA 単離を、RNA easy カラム (Q i a g e n) を用いて製造者のプロトコールに従って行った。Nanodrop 分光光度計を使用して RNA の質および濃度を推定した。cDNA 調製を、Superscript III (T h e r m o) を使用しランダムプライマーを用いて製造者のプロトコールに従って行った。qPCR を、レポータープラスミド内の CTG リピートに隣接する配列内のプライマーを用い、以下のプライマーを使用して行った：

20

【表 5 - 1】

フォワード プライマー	TetCTG DMPK E15 F	TCGGAGCGGTTGTGAACT	配列番号 83
----------------	-------------------	--------------------	---------

30

【表 5 - 2】

リバー プライマー	TetCTG DMPK E15 R	GTTCCCGTTGTTCTGTC	配列番号 84
--------------	-------------------	-------------------	---------

【0345】

CTG リピートレポーターの相対的な存在量を GAPDH に対する正規化によって決定した。次に、CTG 標的化 sgRNA のレベルを非標的化 sgRNA に対して正規化して、付随するデータパッケージに報告される最終的な値を生成した。

【表 6】

CTG標的化 スペーサー	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	配列番号 85
非標的化 対照 スペーサー (λ2)	GTGATAAGTGGAATGCCATG	配列番号 86
sgRNA足場 (Nはスペーサー を示す)	GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAAGAGCUAUGCUG GAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	配列番号 87

10

【0346】

ルシフェラーゼアッセイを、Promega Dual Luciferaseキットを用いて製造者の指示に従って行った。報告された値は、ホタルルシフェラーゼ発光の読み取りとウミシイタケルシフェラーゼ発光の読み取りの比である。

(実施例2)

反復RNA分子およびmRNA分子のRNAによりガイドされる切断

20

【0347】

実験計画：アノテートされたRNAエンドヌクレアーゼ活性を有するヒトタンパク質とCas9 (Streptococcus pyogenesまたはCampylobacter jejuni)との種々の融合物を構築した。上記の融合物をコードするプラスミドを、リピート含有プラスミドまたはルシフェラーゼアッセイプラスミド(ルシフェラーゼタンパク質をコードするmRNA配列を含む)のいずれかと共トランスフェクトした。CTGリピート含有RNAのレベルを、RNAエンドヌクレアーゼ/Cas9融合物を反復RNAと共トランスフェクトした条件下でqPCRを用いて測定した。ルシフェラーゼタンパク質のレベルを、RNAエンドヌクレアーゼ/Cas9融合物をルシフェラーゼアッセイプラスミドと共トランスフェクトした条件下で発光アッセイを使用して測定した。全ての測定値を非標的化sgRNA対照構築物に対して正規化した(図3A~5および図9)。

30

(実施例3)

ウイルスRNA分子のRNAによりガイドされる切断

【0348】

A549細胞を、10% FBSおよび1% ペニシリン/ストレプトマイシン(GIBCO)を伴うDMEM中で培養し、90%~100%の集密度で継代した。細胞を、RNA単離のために24ウェルプレートのウェル当たり細胞 1×10^5 個で播種したか、またはウェル当たり細胞 0.5×10^5 個で播種した。細胞に、遺伝子NTHL1(残基31~312、E43)またはCPSF4L(全長、E67)と融合したCampylobacter jejuni Cas9(CjeCas9)をコードするプラスミドをZika NS5 RNA内の4つの部位のうちの1つをコードするプラスミドと共にトランスフェクトした。CjeCas9はEFSプロモーターによって駆動し、一方、ガイドRNAはU6プロモーターによって駆動した。sgRNAの配列を表1に示す。この試験に使用した構築物の配列を以下に提示する。

40

【0349】

RNA単離を、RNAeasyカラム(Qiagen)を用いて製造者のプロトコールに従って行った。Nanodrop分光光度計を使用してRNAの質および濃度を推定した。cDNA調製を、Superscript III(Thermo)を使用し、ランダムプライマーを用いて製造者のプロトコールに従って行った。qPCRを以下の表2に

50

列挙されているプライマーを用いて行った。

【0350】

図7は、E43エンドヌクレアーゼおよびE67エンドヌクレアーゼの両方の存在下で、表2に示されている種々のNS5標的化スパーサー配列を含有するsgRNAを用いて評価したZika NS5の発現レベルを示す。Zika NS5発現が、対照(ラムダ)スパーサー配列を含有するsgRNAが負荷されたエンドヌクレアーゼと比べた倍率変化として示されている。

【0351】

免疫蛍光顕微鏡法を使用して、CjeCas9と融合したE43またはE67エンドヌクレアーゼの存在下でのZika NS5発現を可視化した。図8Aは、Zika NS5標的化スパーサー配列を含有するsgRNAを負荷したCjeCas9-エンドヌクレアーゼ融合物をトランスフェクトした細胞の免疫蛍光顕微鏡画像を示す。Zika NS5の発現は、適当なZika NS5標的化sgRNAを負荷したCjeCas9-エンドヌクレアーゼ融合物の存在下では、非Zika NS5標的化sgRNAを負荷したCjeCas9-エンドヌクレアーゼ融合物と比較して著しく低減した(図8Aおよび8B)。図6は、本開示の組成物に使用するための例示的なエンドヌクレアーゼの一覧である。

【0352】

【表1-1】

表1: qPCRプライマー

GAPDH_F	CAGCCTCAAGATCATCAGCAA (配列番号 192)
GAPDH_R	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA (配列番号 193)
NS5_F	GAGGAGAGTGCCAGAGTTGT (配列番号 194)

【表1-2】

NS5_R	TCTCTCTCCCCATCCAGTGA (配列番号 195)
--------------	----------------------------------

【0353】

【表2】

表2: sgRNA配列

NS5 標的化スパーサー 1	gcaatgatcttcatgttgggagc (配列番号 196)
NS5 標的化スパーサー 2	gaacctgttgatgaactcttc (配列番号 197)
NS5 標的化スパーサー 3	gttggtgattagagcttcattc (配列番号 198)
NS5 標的化スパーサー 4	gagtgatcctcgttcaagaatcc (配列番号 199)
非標的化対照スパーサー(λ2)	GTGATAAGTGGAATGCCATG (配列番号 200)
sgRNA足場 (Nはスパーサーを示す)	GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAAAGAGCUAUG CUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUUUUU (配列番号 201)

【0354】

E43-CjeCas9およびsgRNAプラスミドは、以下の配列を含み得るまたはそれからなり得る(U6: N=sgRNAスパーサー、E43、CjeCas9):

10

20

30

40

【化 1 5 1 - 1】

gtttattacagggacagcagagatccagtttggttaattaaggtaccgagggcctatttcccatgattcctcatatttgcataacgatacaagg
ctgtagagagataaattagaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatcgtgacgtagaaaagtaataattcttgggtagttg
cagtttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttGTGGAAAGG
ACGAAACACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGTCCCTGAAGGGACTAAAAT
AAAGAGTTTGCGGGACTCTGCGGGGTTACAATCCCCTAAAACCGCTTTTTTTCCTGC
AGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTT
TTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAG
TGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCC
GAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCG
GGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGG
GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTG
CCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTATTTAGAACCatgTGTTCTCCCCAA
GAATCTGGCATGACCGCTCTTTCAGCGAGGATGTTGACGCGAAGCAGATCCCT
GGGACCTGGGGCCGGGCCACGAGGGTGTGCGGAAGAACCAGGACCGTTGCGA
CGGAGGGAAGCAGCAGCGGAAGCTCGGAAATCCCATTCTCCGGTTAAACGACC
CCGCAAGGCACAACGGCTCAGGGTTGCTTACGAGGGGAGCGATTCCGAAAAGG
GTGAAGGAGCAGAGCCCTTGAAGGTTCCAGTATGGGAACCCAGGATTGGCAG
CAGCAGCTTGTAACATCCGAGCAATGAGGAACAAAAAGATGCACCTGTTGA
TCACCTCGGAACCGAACATTGTTATGATTCTAGTGCGCCGCCAAAAGTCCGCC
GGTATCAGGTTCTGTTGAGTTTGTATGCTGAGTAGTCAGACTAAGGACCAGGTT
ACGGCCGGAGCAATGCAACGGCTTCGGGCACGGGGACTCACGGTTCGATAGCAT
TTTGACAGCCGATGACGCAACATTGGGTAAACTCATATATCCAGTTGGCTTCTG
GCGGAGCAAAGTGAAGTACATCAAGCAGACCTCAGCCATTCTCCAACAACATT
ACGGAGGTGATATACCCGCAAGCGTAGCTGAACTGGTAGCACTGCCGGGCGTC
GGTCCCAAAATGGCACATCTGGCTATGGCGGTTGCTTGGGGAACGGTGTCTGG
TATCGCAGTTGATACGCATGTCCACCGCATCGCCAATCGGCTGAGGTGGACTA

10

20

【化 1 5 1 - 2】

AAAAAGCCACTAAGTCTCCTGAAGAAACACGGGCTGCTCTGGAAGAGTGGCTT
 CCACGAGAGCTGTGGCATGAAATCAATGGATTGCTGGTTGGTTTCGGGCAGCA
 GACATGCTTGCCCGTGCACCCCCGGTGTTCATGCTTGCTTGAACCAGGCTTTGT
 GCCCAGCTGCCCAGGGCCTGAGTGGAAAGTGAGACACCGGGAACATCTGAGTCTGC
 GACCCCGGAGAGC^{Cacaac}GCGCGAATCCTGGCCTTCG^{cg}ATTGGCATTAGCAGCAT
CGGCTGGGCATTCTCTGAAAACGACGAACTGAAGGATTGCGGCCTGCGAATTT
TCACTAAGGTCGAAAATCCCAAACACTGGTGAATCACTCGCTCTCCCTAGACGAC
TGGCACGCTCCGCACGAAAGAGGCTTGCCCGCCGCAAGGCACGCTTGAACCAT
CTAAACACCTTATTGCAAATGAGTTTAAACTGAATTATGAGGACTACCAATCC
TTTGACGAGTCTCTTGCTAAAGCCTACAAAGGGAGCCTTATATCCCCGTATGAG
CTCCGGTTCAGAGCACTCAACGAACTGCTGTCCAAACAGGATTTTGCTCGCGT
GATTCTCCACATAGCGAAGAGGCGAGGATACGATGACATTA AAAACAGTGATG
ATAAGGAAAAAGGGGCCATACTCAAAGCGATTAAGCAAATGAAGAGAAGCTC
GCTAACTATCAATCAGTAGGGGAGTATCTCTATAAAGAGTACTTCCAGAAGTTC
AAAGAAAATAGCAAGGAATTTACTAATGTCCGGAATAAAAAGGAGTCTTACGA
AAGATGTATTGCGCAATCTTTCCTCAAGGACGAGCTCAAATTGATTTTCAAGAA
ACAAAGGGAATTTGGGTTTCAAGCTTCTCAAAAAAATTTGAGGAAGAGGTTCTGA
GCGTTGCCTTTTACAAACGCGCCCTTAAGGACTTCTCACATCTCGTAGGGAATT
GTAGTTTCTTACCAGATGAAAAACGGGCGCCAAAAAATAGCCCTTTGGCTTTTA
TGTTTGTCTGCTCTGACTCGCATCATTAATCTGCTCAACAACCTTAAAAACACGG
AAGGGATTCTGTACACAAAGGATGATCTGAACGCTCTGCTTAAACGAAGTTTTGA
AGAACGGGACTTTGACCTACAAACAAACCAAAAAGCTTCTTGGTCTCAGTGATG
ACTACGAATTCAAGGGAGAAAAAGGGACATATTTTCATCGAATTCAAGAAGTATA
AGGAGTTCATCAAAGCCTTGGGCGAGCACAACTTGTCTCAAGATGATCTCAAC
GAAATTGCTAAGGATATCACTCTGATTAAGACGAGATCAAGCTCAAAAAGGC
GTTGGCGAAGTATGACCTTAACCAAAACCAAAATAGATAGCCTCAGCAAGTTGG
AATTTAAAGATCACTTGAATATAAGTTTCAAGGCCCTTAAGTTGGTCACCCCT
TGATGCTTGAAGGAAAGAAATATGATGAGGCATGTAATGAGCTGAATCTCAAG
GTTGCTATTAACGAAGACAAAAAAGATTTCTCCAGCTTTCAATGAGACTTAC
TATAAGGACGAGGTTACCAATCCTGTGGTGTCTCCGAGCCATCAAAGAGTATCG
AAAGGTCCTGAATGCTTTGCTCAAAAAATACGGTAAGGTACACAAAATAAATAT
TGAGCTCGCAAGGGAGGTCCGGTAAGAACCCTCCAGCGCGCCAAAATAGAAA
AGGAACAGAATGAAAATTACAAAGCGAAAAAGGACGCCGAGCTCGAGTGCGAA
AAGCTGGGCCTGAAAATAAACAGCAAGAACATTCTCAAACCTCCGCCTCTTCAA
GAACAAAAAGAATTTTGTGCTTATAGTGGTGAGAAAAATAAAAATCTCCGATCTT
CAAGACGAGAAGATGCTCGAAATAGAC^{cg}ATATATCCATATAGCAGGTCTTTTG
ACGATTCTTACATGAATAAAGTGCTTGTTTTCACTAAGCAGAATCAGGAAAAGT
TGAATCAGACCCCTTTGAGGCCTTTGGCAACGACTCAGCAAAGTGGCAGAAG
ATCGAGGTCTTGGCTAAGAATCTTCTACTAAGAAACAGAAAAGGATATTGGAT
AAGAACTATAAAGACAAAAGAACAAAAGAACTTTAAAGACCGCAACCTCAATGA
CACCAGATACATAGCAAGATTGGTTCTGAACTACACAAAAGATTATTTGGACTT
CTTGCCGCTGTCTGATGATGAGAACACGAACTCAACGACACGCAAAAAGGGGT
CTAAAGTCCACGTCGAAGCTAAATCTGGGATGCTCACCTCAGCATTGAGGCAT
ACGTGGGGATTCTCAGCAAAGGACCGAAACAATCACCTGCACCATGCCATTGA
CGCAGTTATCATAGCGTATGCCAATAATTCAATAGTAAAAGCGTTTAGCGACTT

10

20

30

40

【化151-3】

CAAGAAGGAACAAGAGTCCAACAGCGCCGAGCTCTACGCAAAAAAGATTAGTG
AACTCGACTACAAAAACAAAAGAAAATTCTTTGAGCCGTTACGCGGATTTGAC
AGAAGGTATTGGATAAAATAGATGAAATTTTCGTGAGCAAACCCGAAAGGAAA
AAGCCCTCAGGCGCCTTGCACGAAGAGACTTTCAGGAAGGAAGAGGAATTCTA
CCAAAGCTACGGCGGAAAAGAGGGAGTTTTGAAGGCTCTCGAACTTGGAAAGA
TTAGGAAGGTGAACGGCAAGATAGTGAAAAACGGCGATATGTTCCGGGTTGAT
ATCTTCAAACATAAAAAACGAATAAATTTTATGCTGTGCCTATATACACTATG
GACTTCGCACTTAAGGTCTTCCGAATAAGGCGGTAGCCCGATCTAAAAAAGG
CGAAATTAAGGACTGGATTTTGATGGATGAAAATTACGAGTTCTGCTTTTCTCT
CTACAAGGATTCCTTATATTGATACAGACGAAAGATATGCAGGAACCGGAATT
CGTGTATTACAACGCTTTTACTTCCCTCTACGGTATCTTTGATTGTCTCCAACAT
GACAACAAATTCGAAACACTCAGTAAAAACCAAAGATTCTCTTTAAAAATGCG
AACGAGAAAGAAGTAATTGCAAAATCAATTGGCATCCAAAATTTGAAAGTTTTT
GAAAAATATATAGTATCTGCCCTCGGAGAGGTTACTAAAGCGGAATTTAGACA
GCGAGAGGACTTCAAAAAATCAGGTCCACCCAAGAAAAAACGCAAGGTGGAAGA
 TCCGAAGAAAAAGCGAAAAGTGGATGTG^{taa}CGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGA
 TCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTTGTTTATTGC
 AGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCAT
 TTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC
 TGTATACCG(配列番号 202)

10

20

【0355】

E67-CjeCas9およびsgRNAプラスミドは、以下の配列を含み得るまたはそれからなり得る(U6:N=sgRNAスパーサー、E67、CjeCas9)：

【化152-1】

gtttattacagggacagcagagatccagtttggttaattaaggtaccgagggcctatttccatgattcctcatatttgcatatacagatacaagg
ctttagagagataattagaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataattcttggtagttg
cagttttaaattatgttttaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttgctttatatacttGTGGAAAGG
 ACGAAACACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGTCCCTGAAGGGACTAAAAT
 AAAGAGTTTGCGGGACTCTGCGGGGTTACAATCCCCTAAAACCGCTTTTTTTTCCCTGC
 AGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTT
 TTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAG
 TGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCC
 GAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGCG
 GGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGG
 GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTG
 CCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAGCGCTATTTAGAACC^{atg}CAGGAGGTAATA
 GCGGGGCTTGAGCGATTTACCTTTGCCTTCGAAAAAGACGTAGAGATGCAGAA
 GGAACCGGCCTGCTCCCATTTCAGGTATGGACAAATCAGCATCTGCCGTGT
 GCAATTTTTTCACCAAGGGTCTGTGTGAAAAGGGGAAGCTCTGTCCATTTCCGCC
 ATGATCGCGGAGAGAAGATGGTGGTGTGTAAGCACTGGCTGAGAGGGCTTTGC
 AAAAAAGGCGACCACTGCAAAATTTCTTCACCAATATGACCTGACTCGAATGCCT
 GAGTGTATTTTTACAGTAAGTTCCGGTGACTGTAGCAACAAAGAATGCAGCTTC
 TTGCATGTCAAACCAGCATTCAAGTCACAGGATTGCCCGTGGTACGATCAGGG
 TTTTGTGCAAGGACGGTCCCCTCTGCAAAATATCGACACGTACCCAGAATTATGTG
 CCTTAATTACCTGGTCCGGCTTCTGTCTGAAGGGCCAAAATGTCAGTTTGCTCA

30

40

【化 1 5 2 - 2】

AAAAATTCGCGAGTTCAAATTGCTCCCTGGGTCTAAAATTTGGGAACCCCAGGA
 TTGGCAGCAGCAGCTTGTAACATCCGAGCAATGAGGAACAAAAAGATGCAC
 CTGTTGATCACCTCGGAACCGAACATTGTTATGATTCTAGTGCGCCGCCAAAAG
 TCCGCCGGTATCAGGTTCTGTTGAGTTTGATGCTGAGTAGTCAGACTAAGGAC
 CAGGTTACGGCCGGAGCAATGCAACGGCTTCGGGCACGGGGACTCACGGTCG
 ATAGCATTGTCGAGACCGATGACGCAACATTGGGTAACTCATATATCCAGTTG
 GCTTCTGGCGGAGCAAAGTGAAGTACATCAAGCAGACCTCAGCCATTCTCCAA
 CAACATTACGGAGGTGATATACCCGCAAGCGTAGCTGAACTGGTAGCACTGCC
 GGGCGTCGGTCCCAAATGGCACATCTGGCTATGGCGGTTGCTTGGGGAACGG
 TGTCTGGTATCGCAGTTGATACGCATGTCCACCGCATCGCCAATCGGCTGAGG
 TGGACTAAAAAAGCCACTAAGTCTCCTGAAGAAACACGGGCTGCTCTGGAAGA
 GTGGCTTCCACGAGAGCTGTGGCATGAAATCAATGGATTGCTGGTTGGTTTCG
 GGCAGCAGACATGCTTGCCCGTGCACCCCGGTGTCATGCTTGTGTAACCAG
 GCTTTGTGCCAGCTGCCAGGGCCTGAGTGGAAGTGAGACACCGGGAACATCT
 GAGTCTGCGACCCCGGAGAGC^{cacaaac}GCGCGAATCCTGGCCTTCG^{cg}ATTGGCATT
AGCAGCATCGGCTGGGCATTCTCTGAAAACGACGAACTGAAGGATTGCGGCGT
GCGAATTTTACTAAGGTCGAAAATCCCAAACCTGGTGAATCACTCGCTCTCC
TAGACGACTGGCACGCTCCGCACGAAAGAGGCTTGCCCGCCGCAAGGCACGCT
TGAACCATCTTAAACACCTTATTGCAAATGAGTTTAACTGAATTATGAGGACT
ACCAATCCTTTGACGAGTCTCTTGCTAAAGCCTACAAAGGGAGCCTTATATCC
CGTATGAGCTCCGGTTCAGAGCACTCAACGAACTGCTGTCCAACAGGATTTT
GCTCGCGTGATTCTCCACATAGCGAAGAGGCGAGGATACGATGACATTA AAAA
CAGTGATGATAAGGAAAAAGGGGCCATACTCAAAGCGATTAAGCAAAATGAAG
AGAAGCTCGCTAACTATCAATCAGTAGGGGAGTATCTCTATAAAGAGTACTTCC
AGAAGTTCAAAGAAAATAGCAAGGAATTTACTAATGTCCGGAATAAAAAGGAG
TCTTACGAAAGATGTATTGCGCAATCTTTCCTCAAGGACGAGCTCAAATTGATT
TTCAAGAAACAAAGGGAATTTGGGTTTCAGCTTCTCAAAAAAATTTGAGGAAGA
GGTCTGAGCGTTGCCTTTTACAAACGCGCCCTTAAGGACTTCTCACATCTCGT
AGGGAATTGTAGTTTCTTCACCGATGAAAAACGGGCGCCAAAAAATAGCCCTTT
GGCTTTTATGTTTGTGCTCTGACTCGCATATTAATCTGCTCAACAACCTTAA
AAACACGGAAGGGATTCTGTACACAAAGGATGATCTGAACGCTCTGCTTAAACG
AAGTTTTGAAGAACGGGACTTTGACCTACAAACAAACCAAAGCTTCTTGGTG
TCAGTGATGACTACGAATTC AAGGGAGAAAAAGGGACATATTTTCATCGAATTC
AGAAGTATAAGGAGTTCATCAAAGCCTTGGGCGAGCACAACCTTGTCTCAAGAT
GATCTCAACGAAATTGCTAAGGATATCACTCTGATTAAAGACGAGATCAAGCTC
AAAAAGGCGTTGGCGAAGTATGACCTTAACCAAACCAAATAGATAGCCTCAG
CAAGTTGGAATTTAAAGATCACTTGAATATAAGTTTCAAGGCCCTTAAAGTTGGT
CACCCCTTGATGCTTGAAGGAAAGAAATATGATGAGGCATGTAATGAGCTGA
ATCTCAAGGTTGCTATTAACGAAGACAAAAAAGATTTCCCTCCAGCTTTCAATG
AGACTTACTATAAGGACGAGGTTACCAATCCTGTGGTGCTCCGAGCCATCAA
GAGTATCGAAAGGTCCTGAATGCTTTGCTCAAAAAATACGGTAAGGTACACAA
AATAAATATTGAGCTCGCAAGGGAGGTCGGTAAGAACCACTCCAGCGCGCCA
AAATAGAAAAGGAACAGAATGAAAATTACAAAGCGAAAAAGGACGCCGAGCTC
GAGTGCGAAAAGCTGGGCCTGAAAATAAACAGCAAGAACATTCTCAAACCTCCG
CCTCTTCAAAGAACAAAAAGAATTTTGTGCTTATAGTGGTGAGAAAAATAAAAT

10

20

30

40

【化 1 5 2 - 3】

CTCCGATCTTCAAGACGAGAAGATGCTCGAAATAGACgcgATATATCCATATAGC
AGGTCTTTTGACGATTCTTACATGAATAAAGTGCTTGTTCCTACTAAGCAGAAT
CAGGAAAAGTTGAATCAGACCCCTTTGAGGCCTTTGGCAACGACTCAGCAA
GTGGCAGAAGATCGAGGTCTTGGCTAAGAATCTTCTACTAAGAAACAGAAA
GGATATTGGATAAGAACTATAAAGACAAAAGAACAAGAAGACTTTAAAGACCGC
AACCTCAATGACACCAGATACATAGCAAGATTGGTTCTGAACTACACAAAAGAT
TATTTGGACTTCTTGCCGCTGTCTGATGATGAGAACACGAACTCAACGACAG
CAAAGGGGTCTAAAGTCCACGTCGAAGCTAAATCTGGGATGCTCACCTCAGC
ATTGAGGCATACGTGGGGATTCTCAGCAAAGGACCGAAACAATCACCTGCACC
ATGCCATTGACGCAGTTATCATAGCGTATGCCAATAATTCAATAGTAAAAGCGT
TAGCGACTTCAAGAAGGAACAAGAGTCCAACAGCGCCGAGCTCTACGCAAAA
AAGATTAGTGAAGTCACTACAAAAACAAAAGAAAATTCTTTGAGCCGTTACGC
GGATTTTCGACAGAAGGTATTGGATAAAAATAGATGAAATTTTCGTGAGCAAACCC
GAAAGGAAAAAGCCCTCAGGCGCCTTGCACGAAGAGACTTTCAGGAAGGAAGA
GGAATTCTACCAAAGCTACGGCGGAAAAGAGGGAGTTTTGAAGGCTCTCGAAC
TTGGAAGATTAGGAAGGTGAACGGCAAGATAGTGAAAAACGGCGATATGTTC
CGGGTTGATATCTTCAAACATAAAAAACGAATAAATTTTATGCTGTGCCTATA
TACACTATGGACTTCGCACTTAAGGTCCTGCCGAATAAGGCGGTAGCCCGATC
TAAAAAAGGCGAAATTAAGGACTGGATTTTGATGGATGAAAATTACGAGTTCTG
CTTTTCTCTTACAAGGATTCCCTTATATTGATACAGACGAAAGATATGCAGGA
ACCGGAATTCGTGTATTACAACGCTTTTACTTCTCTACGGTATCTTTGATTGT
CTCCAAACATGACAACAAATTCGAAACACTCAGTAAAAACCAAAGATTCTCTT
TAAAAATGCGAACGAGAAAGAAGTAATTGCAAAATCAATTGGCATCCAAAATTT
GAAAGTTTTTGAAAAATATATAGTATCTGCCCTCGGAGAGGTTACTAAAGCGGA
ATTTAGACAGCGAGAGGACTTCAAAAATCAGGTCCACCCAAGAAAAAACGCAA
GGTGAAGATCCGAAGAAAAAGCGAAAAGTGGATGTGtaaCGTTTTCCGGGACGCCG
GCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACT
TGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA
ATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATC
TTATCATGTCTGTATACCG (配列番号 203)

10

20

30

参照による組込み

【0356】

あらゆる相互参照されるまたは関連する特許または出願を含めた、本明細書において引用されているあらゆる文書は、明白に排除されるまたは他のやり方で限定される場合を除き、これによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いずれの文書の引用も、それが本明細書に開示されるもしくは具体化されるあらゆる発明に対して先行技術であること、または、単独で、もしくは任意の他の参考文献（複数可）との任意の組合せで、あらゆるそのような発明を教示、示唆もしくは開示するものであることを認めるものではない。さらに、本文書における用語のいずれかの意味または定義が参照により組み込まれる文書における同じ用語のいずれかの意味または定義と矛盾する範囲では、本文書におけるその用語に割り当てられた意味または定義が支配するものとする。

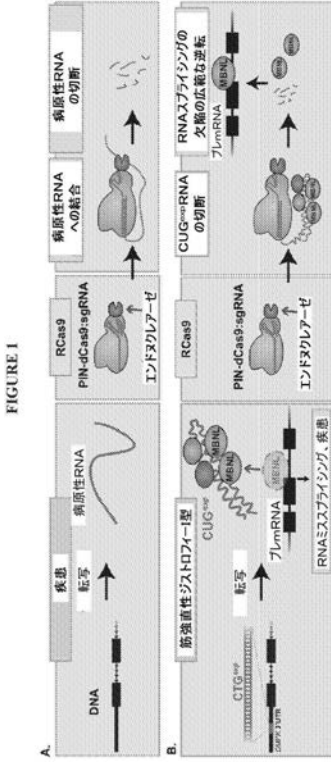
40

他の実施形態

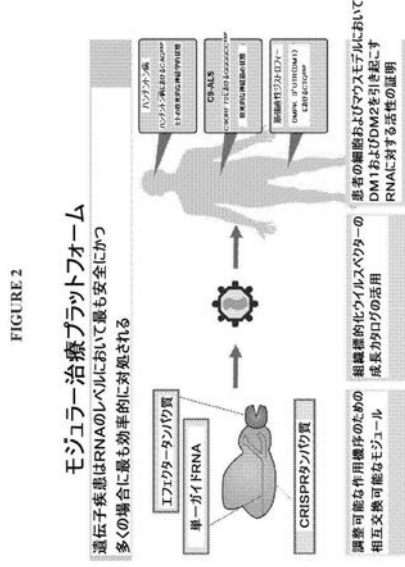
【0357】

本開示の特定の実施形態を例示し、記載したが、種々の他の変化および改変を本開示の主旨および範囲から逸脱することなく行うことができる。添付の特許請求の範囲は、本開示の範囲内に入るそのような変化および改変の全てを包含する。

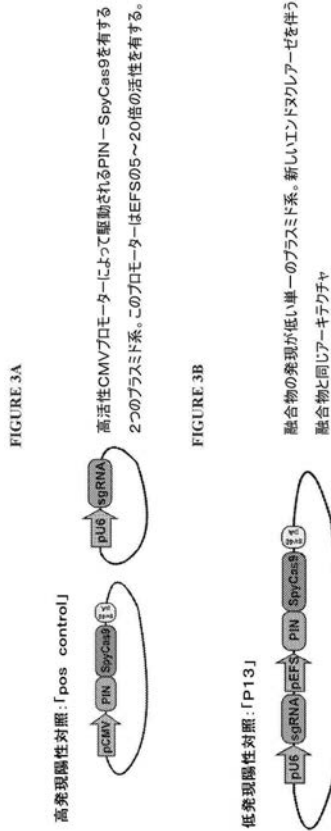
【 図 1 】



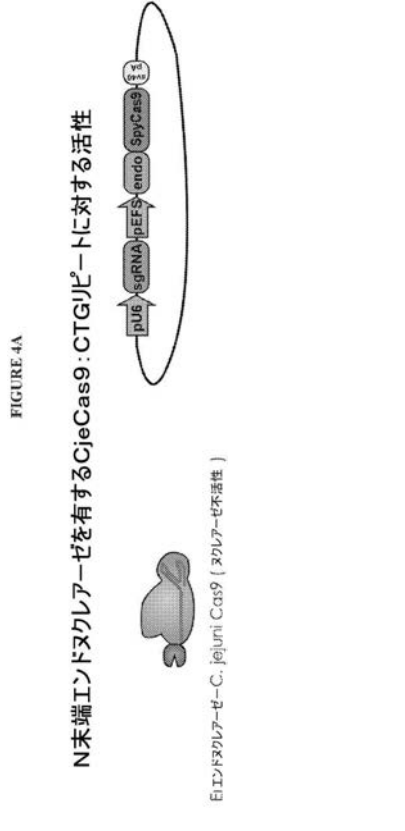
【 図 2 】



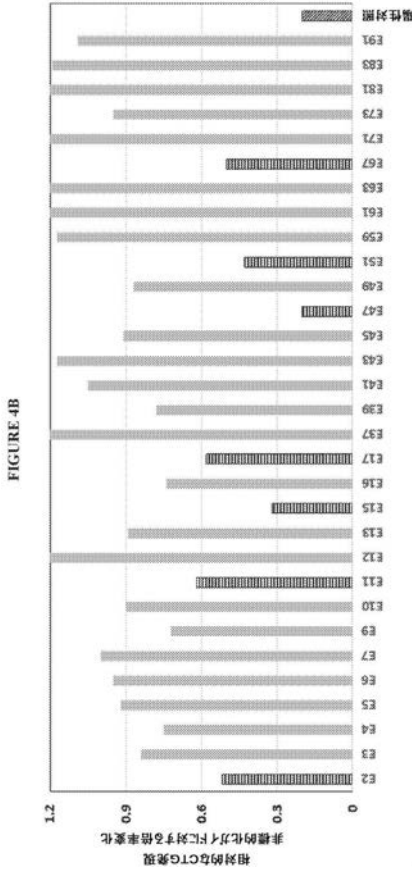
【 図 3 】



【 図 4 A 】



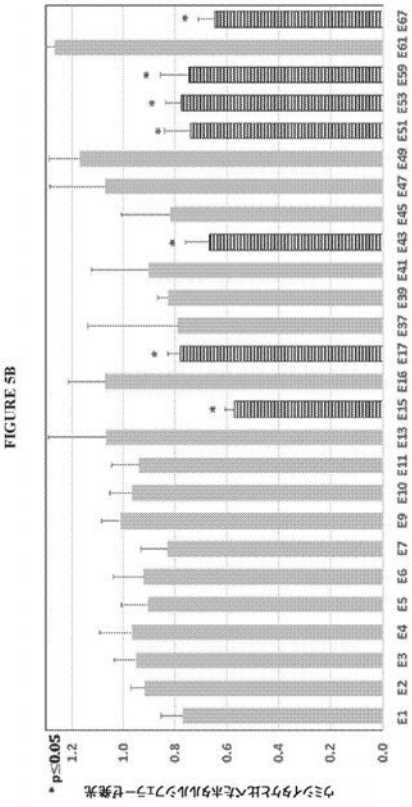
【 図 4 B 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 】

FIGURE 6

エンドヌクレアーゼ名の略語一覧

E1	RNAse1
E2	RNAse4
E3	RNAse6
E4	NOB1
E5	EndoV
E6	FEN1
E7	SIFN14
E8	LACTB2
E9	RNAse7
E10	RNAse8
E11	RNAse2
E12	ANG
E13	HRSPI2
E14	RNAse6PL
E15	RNAseL
E16	RNAse6T2
E17	ZC3H12A
E37	RIDA
E39	RNAse11
E41	POU6
E43	NTHL1
E45	KIAA0391
E47	APEX1
E49	Ago2
E51	ZC3H12A
E53	DIOG
E55	ZC3H12D
E57	ERN2
E59	ENDOG
E61	PILO
E63	YBEY
E65	ENDOD1
E67	CP64L
E69	KCC_2002731
E71	KCC_2002731
E73	ENCL1
E75	RAC1
E77	APDC4
E79	APDC3_350
E81	RAA1_25-156
E83	RAB1
E85	RNAseK
E87	DNB2_FL
E89	RNAseI[0438]
E91	RNAseI[M41R, D12E]
E93	RNAseI[M41R, D12E, H119N]
E95	RNAseI[H119N]
E97	RNAseI[0390, N070, N88A, G88D, R81D, H115N]
E99	RNAseI[0390, N070, N88A, G88D, R81D, H115N, I41R, D12E]
E100	RNAseI_0390, N070, N88A, G88D, R81D, H115N, I41R, D12E]
E101	RNAseI[0390, N070, N88A, G88D, R81D]

FIGURE 7A

【 図 7 A 】

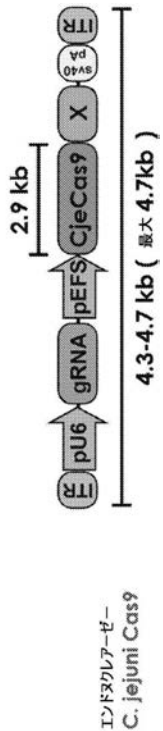


FIGURE 7B

【 図 7 B 】

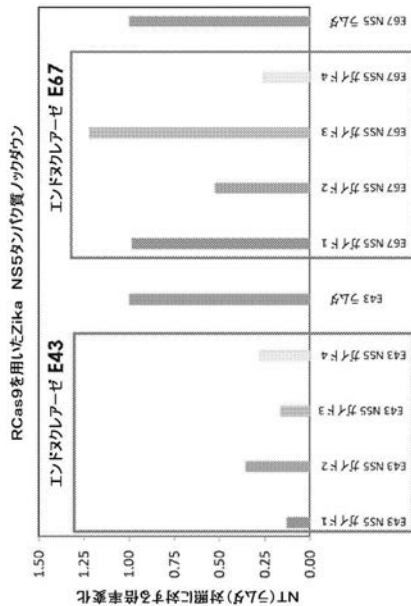


FIGURE 8A

【 図 8 A 】

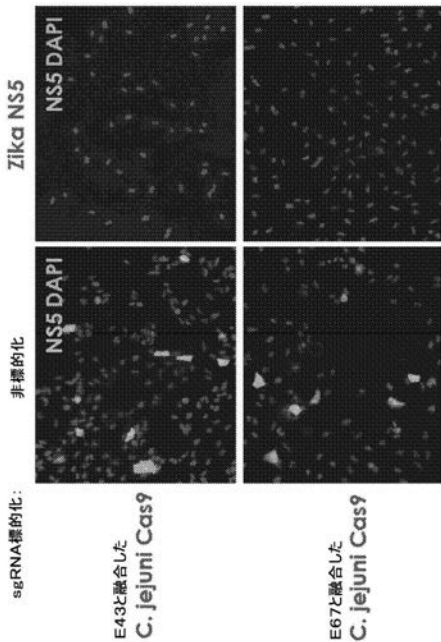
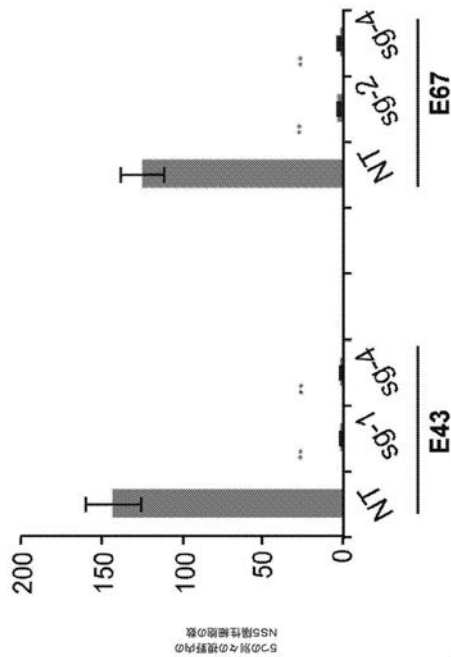
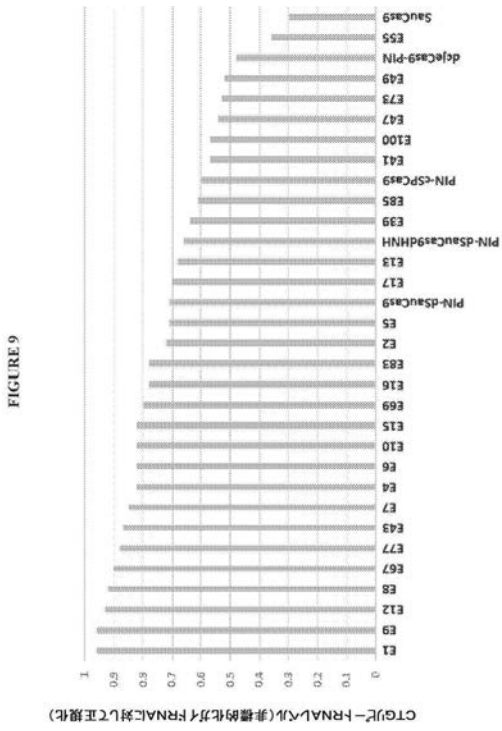


FIGURE 8B

【 図 8 B 】



【 図 9 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和3年3月10日 (2021.3.10)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

202152685800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/036021

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

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

- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 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:

SEQ ID NOs: 18, 19, 80, and 81 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/036021

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 9/22; C12N 15/113 (2019.01) CPC - C07K 2319/85; C12N 9/22; C12N 15/113; C12N 2310/20 (2019.08)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/199; 435/69.7 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2017/0145394 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 25 May 2017 (25.05.2017) entire document	1-12, 14-17, 19, 20 13, 18
Y	US 2017/0088845 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al) 30 March 2017 (30.03.2017) entire document	13
Y	US 2013/0178513 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC. et al) 11 July 2013 (11.07.2013) entire document	18
A	US 2017/0314002 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 02 November 2017 (02.11.2017) entire document	1-20
A	WO 2015/089486 A2 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al) 18 June 2015 (18.06.2015) entire document	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 04 September 2019		Date of mailing of the international search report 27 SEP 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/22 (2006.01)	C 1 2 N 9/22	Z N A

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 ネルズ, デイビッド エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ホプキンズ コート
3 5 4 5, スイート 2 0 0

(72) 発明者 パトラ, ランジャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ホプキンズ コート
3 5 4 5, スイート 2 0 0

(72) 発明者 イェオ, ユージーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ホプキンズ コート
3 5 4 5, スイート 2 0 0

F ターム(参考) 4B050 CC05 CC07 LL01

4B065 AA93X AB01 BA02 BB01 CA24 CA27 CA44