(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-532968
(P2020-532968A)
(43)公表日　令和2年11月19日(2020.11.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/55	(2006.01)	C12N	15/55		4B050
C12N 9/22	(2006.01)	C12N	9/22	ZNA	4B063
C12Q 1/6811	(2018.01)	C12Q	1/6811	Z	4B065
C12Q 1/6818	(2018.01)	C12Q	1/6818	Z	
C12N 15/11	(2006.01)	C12N	15/11	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 141 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-511377 (P2020-511377)
(86)(22)出願日　平成30年8月22日 (2018.8.22)
(85)翻訳文提出日　令和2年3月27日 (2020.3.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/047597
(87)国際公開番号　WO2019/040664
(87)国際公開日　平成31年2月28日 (2019.2.28)
(31)優先権主張番号　62/572,963
(32)優先日　平成29年10月16日 (2017.10.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　15/937,699
(32)優先日　平成30年3月27日 (2018.3.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　513037649
ソーク　インスティテュート　フォー　バイオロジカル　スタディーズ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２０３７，　ラ　ホヤ，　ノース　トレイ　パインズ　ロード　１００１０
(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標的化方法および組成物

(57)【要約】
標的ＲＮＡの検出、編集、または修飾に使用することができる、ＲＮＡ分子を標的にするためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ方法および組成物が、本明細書において提供される。本開示は、ＲＮＡを修飾する（検出することを含む）ためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であって、新規なＣａｓ１３ｄタンパク質（ＣａｓＲおよびｎＣａｓ１とも称される）およびガイドＲＮＡを利用する、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に関する。従来のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、２０～３０ｎｔのＲＮＡを認識するように再プログラミングすることができるが、それらは、サイズが大きいため（約１２００アミノ酸、ａａ）、主要な細胞およびｉｎ　ｖｉｖｏ送達のためにＡＡＶにパッケージすることが困難となっている。本開示はこのような従来技術の課題を克服し得る。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標的にする方法であって、
１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、天然に存在しないかまたは操作されたクラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文構造のリピート（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）系と接触させるステップであって、前記系が、
少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質または前記少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸分子、および
前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子とハイブリダイズする少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、または前記ｇＲＮＡをコードする少なくとも１つの核酸分子
を含み、
それによって、前記Ｃａｓ１３ｄタンパク質が、前記ｇＲＮＡと複合体を形成し、前記ｇＲＮＡが、前記複合体を、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子へと指向させ、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標的にする、ステップ
を含む、方法。
【請求項２】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に媒介されるＲＮＡ標的化方法であって、
１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、天然に存在しないかまたは操作されたクラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文構造のリピート（ＣＲＩＳＰＲ）－ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）系と接触させるステップであって、前記系が、
少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質または前記少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸分子、および
前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子とハイブリダイズする少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ｇＲＮＡ、または前記ｇＲＮＡをコードする少なくとも１つの核酸分子を含み、
それによって、前記Ｃａｓ１３ｄタンパク質が、前記ｇＲＮＡと複合体を形成し、前記ｇＲＮＡが、前記複合体を、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子へと指向させ、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標的にする、ステップ
を含む、方法。
【請求項３】
前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、前記天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と接触させるステップが、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を含有する細胞に、前記天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を導入することを含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系が、エンドサイトーシス、リポソーム、粒子、エクソソーム、微細小胞、遺伝子銃、エレクトロポレーション、ウイルス、またはこれらの組合せを使用して、前記細胞に導入される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記細胞が、真核生物細胞である、請求項３または４に記載の方法。
【請求項６】
前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子または前記細胞が、前記少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質および前記少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ｇＲＮＡを含む複合体と接触する、請求項１から５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質が、
１つまたは複数のＨＥＰＮドメインを含むか、
１５０ｋＤ以下、１４０ｋｄ以下、１３０ｋＤ以下、１２０ｋＤ以下、例えば、約９０～１２０ｋＤ、約１００～１２０ｋＤ、または約１１０ｋＤであるか、

１つまたは複数の変異型ＨＥＰＮドメインを含み、前記ガイドＲＮＡをプロセシングすることができるが、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を切り離すことはできないか、
原核生物ゲノムまたはメタゲノム、消化管メタゲノム、活性汚泥メタゲノム、嫌気性消化器メタゲノム、ニワトリ消化管メタゲノム、ヒト消化管メタゲノム、ブタ消化管メタゲノム、ウシ消化管メタゲノム、ヒツジ消化管メタゲノム、ヤギ消化管メタゲノム、カピバラ消化管メタゲノム、霊長類消化管メタゲノム、シロアリ消化管メタゲノム、糞便メタゲノム、Ｏｒｄｅｒ　Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌｅｓまたは Ｆａｍｉｌｙ　Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃａｃｅａｅ由来のゲノムに由来するＣａｓ１３ｄオルソログを含むか、
Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ａｌｂｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＦＤ－１、無培養Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ　ＴＳ２８－ｃ４０９５、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｂｉｃｉｒｃｕｌａｎｓ、またはＲｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ　ＣＡＧ５７に由来するＣａｓ１３ｄオルソログを含むか、
配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を含むか、
配列番号１９５、１９６、または１９７に示されるモチーフを含むか、
配列番号２８８、２８９、２９０、または２９１に示されるコンセンサス配列を含むか、
１つまたは複数のアミノ酸欠失を含むか、
１つまたは複数のアミノ酸挿入を含むか、
共送達された場合に全長機能性酵素を再構成することができる、２つまたはそれを上回る断片に分割されているか、
異なるＣａｓ１３ｄオルソログのキメラとなるように修飾されているか、
少なくとも１％、例えば、１～１０％短縮されているか、
必要に応じて、１つまたは複数の細胞内局在化シグナル、エフェクタードメイン、精製タグ、親和性タグをさらに含むか、または
これらの組合せである、請求項１から６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】

前記少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする前記核酸分子が、
真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、
原核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、

ヒト細胞における発現のためにコドン最適化されており、配列番号１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１４２、１４３、１４４、または１４５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％の配列同一性を含む、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、

配列番号１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１３９、１４０、または１４１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％の配列同一性を含む、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、

配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を含むタンパク質をコードする、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、

原核生物ゲノムまたはメタゲノムに由来する少なくとも１つのＣａｓ１３ｄオルソログ、または

消化管メタゲノム、活性汚泥メタゲノム、嫌気性消化器メタゲノム、ニワトリ消化管メタゲノム、ヒト消化管メタゲノム、ブタ消化管メタゲノム、ウシ消化管メタゲノム、ヒツジ消化管メタゲノム、ヤギ消化管メタゲノム、カピバラ消化管メタゲノム、霊長類消化管メタゲノム、シロアリ消化管メタゲノム、糞便メタゲノム、Ｏｒｄｅｒ　Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌｅｓまたは Ｆａｍｉｌｙ　Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃａｃｅａｅ由来のゲノムに由来する少なくとも１つのＣａｓ１３ｄオルソログ

を含む、請求項１から７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項９】

前記少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする前記核酸分子が、前記少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列に作動可能に連結したプロモーターを含み、必要に応じて、ベクターの一部である、請求項１から８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０】

前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子とハイブリダイズするｇＲＮＡが、

成熟ｇＲＮＡ、

プレｇＲＮＡ、

１つまたは複数の全長または短縮型ダイレクトリピート（ＤＲ）配列、

１つまたは複数のスペーサー配列、

ＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサーを含む、１つまたは複数の配列、
配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５４、１５６、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９１、１９２、１９３、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５、２１７、２１９、２２１、２２３、２２５、２２７、２２８、２３０、２３２、２３４、２３６、２３８、２４０、２４２、２４４、２４６、２４８、２５０、２５２または２５４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％の配列同一性を含む、１つまたは複数のＤＲ配列、
必要に応じて、前記ｇＲＮＡに挿入された核酸アプタマー、
またはこれらの組合せ
を含む、請求項１から９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標的にするステップが、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を切り離すこと、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子にニックを入れること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を活性化すること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を脱活性化すること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を視覚化または検出すること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標識すること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を結合すること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を濃縮すること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を枯渇させること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を編集すること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を輸送すること、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子をスプライシングするかまたはその前記スプライシングを撹乱させること、および前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子をマスクすることのうちの１つまたは複数を含む、請求項１から１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を修飾するステップが、
ＲＮＡ塩基置換、
ＲＮＡ塩基欠失、
ＲＮＡ塩基挿入、
標的ＲＮＡにおける破断、
エクソンの排除、
エクソンの包含、
ＲＮＡスプライシングの撹乱、
前記ＲＮＡ分子の翻訳の撹乱、
ＲＮＡのメチル化、
ＲＮＡの脱メチル化
のうちの１つまたは複数を含む、請求項１から１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子が、非コードＲＮＡである、請求項１から１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記方法が、疾患を処置し、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子が、前記疾患と関連している、請求項１から１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
複数のｇＲＮＡが、アレイの一部である、請求項１から１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記方法が、診断方法であり、

前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、前記天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と接触させるステップが、前記天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を、前記１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を含む試料および標識を含む別個のＲＮＡと接触させることを含み、

必要に応じて、前記試料に存在する核酸分子を転写させること、

必要に応じて、前記試料に存在する核酸分子を増幅させること、および

前記標識を検出すること

を含み、前記標識を検出することが、前記試料における１つまたは複数の標的ＲＮＡの存在を示す、請求項１から１５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１７】

前記試料が、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＲＮＡに変換および／もしくは増幅されるゲノムＤＮＡ、生物学的患者試料、または環境試料を含む、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

標識を含む前記ＲＮＡが、フルオロフォアおよびクエンチャーを含むＲＮＡを含み、前記標識を検出することが、前記フルオロフォアから放出される蛍光を検出することを含むか、

標識を含む前記ＲＮＡが、フルオロフォアを含むＲＮＡを含み、前記標識を検出することが、前記フルオロフォアから放出される蛍光を検出することを含むか、または

標識を含む前記ＲＮＡが、非蛍光性分子を含むＲＮＡを含み、前記標識を検出することが、前記非蛍光性分子を検出することを含む、請求項１６または１７に記載の方法。

【請求項１９】

ｅｘ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｖｉｔｒｏ、または無細胞系において行われる、請求項１から１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２０】

配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６に対する少なくとも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％の配列同一性、

配列番号１９５、１９６、１９７、２８８、２８９、２９０、または２９１に示されるモチーフ、

原核生物ゲノムまたはメタゲノム、消化管メタゲノム、活性汚泥メタゲノム、嫌気性消化器メタゲノム、ニワトリ消化管メタゲノム、ヒト消化管メタゲノム、ブタ消化管メタゲノム、ウシ消化管メタゲノム、ヒツジ消化管メタゲノム、ヤギ消化管メタゲノム、カピバラ消化管メタゲノム、霊長類消化管メタゲノム、シロアリ消化管メタゲノム、糞便メタゲノム、Ｏｒｄｅｒ ＣｌｏｓｔｒｉｄｉａｌｅｓまたはＦａｍｉｌｙ Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃａｃｅａｅ由来のゲノムに由来するＣａｓ１３ｄオルソログ、または

これらの組合せ
を含む、単離されたタンパク質。
【請求項２１】
Ｃａｓ１３ｄオルソログが、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ａｌｂｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｒａｅｕｍ、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ ＦＤ－１、無培養Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ ＴＳ２８－ｃ４０９５、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｂｉｃｉｒｃｕｌａｎｓ、またはＲｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ ＣＡＧ５７に由来するＣａｓ１３ｄオルソログを含む、請求項２０に記載の単離されたタンパク質。
【請求項２２】
細胞内局在化シグナルをさらに含む、請求項２０または２１に記載の単離されたタンパク質。
【請求項２３】
少なくとも１つの天然のＨＥＰＮドメインにおける変異を含む、請求項２０から２２のいずれか１項に記載の単離されたタンパク質。
【請求項２４】
配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５４、１５６、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９１、１９２、１９３、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５、２１７、２１９、２２１、２２３、２２５、２２７、２２８、２３０、２３２、２３４、２３６、２３８、２４０、２４２、２４４、２４６、２４８、２５０、２５２または２５４、またはそれらの短縮されたバージョン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％の配列同一性を含む１つまたは複数のダイレクトリピート（ＤＲ）配列を含む、単離されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）。
【請求項２５】
標的ＲＮＡに特異的な１つまたは複数のスペーサー配列をさらに含む、請求項２４に記載の単離されたｇＲＮＡ。
【請求項２６】
請求項２０から２３のいずれか１項に記載の単離されたタンパク質、および
請求項２４または２５に記載の単離されたｇＲＮＡ
を含む、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体。
【請求項２７】
請求項２０から２３のいずれか１項に記載のタンパク質をコードする、単離された核酸分子。
【請求項２８】
配列番号１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１３９、１４０、または１４１に対する少なくとも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％の配列同一性、
配列番号１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１４２、１４３、１４４、または１４５に対する少なくとも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％の配列同一性を含むか、または
配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、

２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６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％の配列同一性を有するタンパク質配列をコードする、請求項２７に記載の単離された核酸分子。

【請求項２９】

請求項２７または２８に記載の単離された核酸分子を含む、組換えベクター。

【請求項３０】

プラスミドまたはウイルスベクターを含む、請求項２９に記載の組換えベクター。

【請求項３１】

請求項２７または２８に記載の単離された核酸分子が、プロモーターに作動可能に連結している、請求項２９または３０に記載の組換えベクター。

【請求項３２】

請求項２４または２５に記載の少なくとも１つのｇＲＮＡ、請求項２０から２３のいずれかに記載のｎＣａｓ１タンパク質をコードする少なくとも１つの配列、または両方をさらに含む、請求項２７から２８のいずれかに記載のベクター。

【請求項３３】

請求項２０から２３のいずれか１項に記載の単離されたタンパク質、および請求項２４または２５に記載の単離されたｇＲＮＡ、請求項２６に記載のＲＮＰ複合体、請求項２７から２８のいずれか１項に記載の単離された核酸分子、請求項２９から３２のいずれか１項に記載のベクター、またはこれらの組合せを含む、非細菌細胞。

【請求項３４】

請求項２０から２３のいずれか１項に記載の単離されたタンパク質、および請求項２４または２５に記載の単離されたｇＲＮＡ、請求項２６に記載のＲＮＰ複合体、請求項２７から２８のいずれか１項に記載の単離された核酸分子、請求項２９から３２のいずれか１項に記載のベクター、またはこれらの組合せを含む、細菌細胞であって、請求項２０から２３のいずれか１項に記載の単離されたタンパク質、請求項２４または２５に記載の単離されたｇＲＮＡ、請求項２６に記載のＲＮＰ複合体、請求項２７から２８のいずれか１項に記載の単離された核酸分子、請求項２９から３２のいずれか１項に記載のベクターが、前記細菌細胞にとって天然ではない、細菌細胞。

【請求項３５】

請求項２０から２３のいずれか１項に記載の単離されたタンパク質、
請求項２４または２５に記載のｇＲＮＡ、
請求項２６に記載のＲＮＰ複合体、
請求項２７から２８のいずれか１項に記載の単離された核酸分子、
請求項２９から３２のいずれか１項に記載のベクター、および／または
請求項３３に記載の非細菌細胞、および／または
請求項３４に記載の細菌細胞のうちの１つまたは複数と、

薬学的に許容される担体と
を含む、組成物。
【請求項３６】
請求項２０から２３のいずれか１項に記載の単離されたタンパク質、
請求項２４または２５に記載のｇＲＮＡ、
請求項２６に記載のＲＮＰ複合体、
請求項２７から２８のいずれか１項に記載の単離された核酸分子、
請求項２９から３２のいずれか１項に記載のベクター、および／または
請求項３３に記載の非細菌細胞、および／または
請求項３４に記載の細菌細胞、および／または
請求項３５に記載の組成物
のうちの１つまたは複数を含む、キット。
【請求項３７】
送達系、標識、または両方をさらに含む、請求項３６に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１７年８月２２日に出願された米国仮出願第６２／５４８，８４６号、２０１７年１０月１６日に出願された米国仮出願第６２／５７２，９６３号、２０１８年３月６日に出願された米国仮出願第６２／６３９，１７８号、および２０１８年３月２７日に出願された米国出願第１５／９３７，６９９号に基づく優先権を主張し、これらの全ては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
分野
本開示は、ＲＮＡを修飾する（検出することを含む）ためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であって、新規なＣａｓ１３ｄタンパク質（ＣａｓＲおよびｎＣａｓ１とも称される）およびガイドＲＮＡを利用する、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に関する。
【０００３】
政府の支援に関する謝辞
本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈにより付与された、５ ＤＰ５ ＯＤ０２１３６９－０２および５ Ｒ２１ ＡＧ０５６８１１－０２のもとに、政府の支援によりなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００４】
背景
細胞機能および疾患におけるトランスクリプトーム変化のマッピングは、過去２０年間にわたる技術進歩によって、マイクロアレイ（Schena et al., 1995）から、次世代シーケンシングおよび単一細胞研究（Shendure et al., 2017）へと転換した。しかしながら、個々の転写物の動力学の機能を調べ、観察された転写の変化と細胞表現型との間の因果関係を確立するには、所望される転写物を能動的に管理またはモジュレートする能力が必要である。
【０００５】
ＤＮＡ操作技術、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９（Doudna and Charpentier, 2014; Hsu et al., 2014）により、研究者らが、特定の遺伝子エレメントの機能を分析すること、または疾患の素因となる変異を正すことが可能となる。しかしながら、ＲＮＡの研究および取り扱いのための単純で拡張可能なツールは、ＤＮＡ対応物に相当に遅れをとっている。既存のＲＮＡ干渉技術は、所望される転写物の切断または阻害を可能にするものであるが、相当なオフターゲット作用を有し、内因性プロセスにおける主要な役割に起因して、困難な操作標的のままである（Birmingham et al., 2006; Jackson et

al., 2003）。結果として、ＲＮＡの機能的役割を直接的に研究するための方法は、限定的なままである。

【０００６】

ＲＮＡ操作における重大な制限の１つは、容易に再標的化および標的細胞への導入が可能であるＲＮＡ結合ドメインの欠如である。ＭＳ２　ＲＮＡ結合ドメインは、例えば、不変の２１ヌクレオチド（ｎｔ）のＲＮＡ配列を認識するため（Peabody, 1993）、所望される転写物をタグするためにはゲノム修飾が必要である。Ｐｕｍｉｌｉｏ相同性ドメインは、それぞれのタンパク質モジュールが別個のＲＮＡ塩基を認識するモジュラーのリピートを有するが、それらは短い８ｎｔのＲＮＡ配列を標的にすることしかできない（Cheong and Hall, 2006）。これまでに特徴付けられているＩＩ型（Batra et al., 2017; O'Connell et al., 2014）およびＶＩ型（Abudayyeh et al., 2016; East-Seletsky et al., 2016）のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、２０～３０ｎｔのＲＮＡを認識するように再プログラミングすることができるが、それらは、サイズが大きいため（約１２００アミノ酸、ａａ）、主要な細胞およびｉｎ　ｖｉｖｏ送達のためにＡＡＶにパッケージすることが困難となっている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

要旨

本出願は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓリピートアレイの配列シグネチャーを識別するため、およびＲＮＡ標的化ツールに使用することができるこれまでに特徴付けされていなかったコンパクトなＣａｓリボヌクレアーゼを発掘するための原核生物ゲノムのバイオインフォマティック分析を提供する。操作されたＶＩ－Ｄ型ＣＲＩＳＰＲエフェクターを使用して、ヒト細胞において内因性ＲＮＡを効率的にノックダウンさせ、選択的スプライシングを扱い、ＲＮＡ標的化適用およびトランスクリプトーム操作ツールボックスの一部としてのさらなるエフェクタードメイン融合体の道を開くことができる。

【０００８】

１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を修飾する方法、例えば、クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文構造のリピート（ＣＲＩＳＰＲ）－ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）系に媒介されるＲＮＡ編集方法が、本明細書において提供される。そのような方法は、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、天然に存在しない（例えば、それが導入される細胞または系に天然に存在しない）か操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と接触させるステップを含み得る。そのようなＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系には、（１）本明細書において提供される少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質または少なくとも１つのＣａｓ１３ｄ核酸コード配列（例えば、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質をコードするｍＲＮＡまたはベクター）、および（２）１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子とハイブリダイズする少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ガイド核酸分子（例えば、ガイドＲＮＡ、ｇＲＮＡ）、またはｇＲＮＡをコードする少なくとも１つの核酸分子が含まれ得る。Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成し、ｇＲＮＡは、複合体を、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子へと指向させ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を修飾する（例えば、切り離す、検出する）。一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子（または１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を含有する細胞）を、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質および少なくとも１つのｇＲＮＡを含む複合体と接触させる。一部の例では、系は、Mg^{2+}を含む。しかしながら、標的ＲＮＡの切断が所望されない場合など、一部の例では、系は、Mg^{2+}を含まない。

【０００９】

一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と接触させるステップは、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を含有する細胞（例えば、真核生物細胞または原核生物細胞）に、例えば、エンドサイトーシス、リポソーム、粒子、エクソソーム、微細小胞、遺伝子銃、エレクトロポレーショ

ン、ウイルス、またはこれらの組合せを使用して、天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を導入することを含む。一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と接触させるステップは、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を含有する無細胞系（例えば、生物学的試料もしくは環境試料、または細胞ライセート）を、天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と（例えば、標的ＲＮＡを検出するための診断方法において）接触させることを含む。

【００１０】

一部の例では、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質は、（１）１つまたは複数のＨＥＰＮドメインを含むか、（２）１５０ｋＤ以下（例えば、１４０ｋＤ以下、１３０ｋＤ以下、１２０ｋＤ以下、例えば、約９０～１２０ｋＤ、約１００～１２０ｋＤ、または約１１０ｋＤである）か、（３）１つまたは複数の変異型ＨＥＰＮドメインを含み、ガイドＲＮＡをプロセシングすることができるが、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を切断することも切り離すこともできないか、（４）原核生物ゲノムまたはメタゲノム、消化管メタゲノム、活性汚泥メタゲノム、嫌気性消化器メタゲノム、ニワトリ消化管メタゲノム、ヒト消化管メタゲノム、ブタ消化管メタゲノム、ウシ消化管メタゲノム、ヒツジ消化管メタゲノム、ヤギ消化管メタゲノム、カピバラ消化管メタゲノム、霊長類消化管メタゲノム、シロアリ消化管メタゲノム、糞便メタゲノム、Ｏｒｄｅｒ　ＣｌｏｓｔｒｉｄｉａｌｅｓまたはＦａｍｉｌｙ　Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃａｃｅａｅ由来のゲノムに由来するＣａｓ１３ｄオルソログを含むか、（５）Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ａｌｂｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ、ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＦＤ－１、無培養のＥｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ　ＴＳ２８－ｃ４０９５、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｂｉｃｉｒｃｕｌａｎｓ、またはＲｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ　ＣＡＧ５７に由来するＣａｓ１３ｄオルソログを含むか、（６）配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６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％、もしくは１００％の配列同一性を含むか、または（７）これらの組合せ（例えば、１～６のうちのいずれかの組合せ）である。一部の例では、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８

４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有し、配列番号１９５、１９６、または１９７に示される少なくとも１つのモチーフを含む。一部の例では、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有し、配列番号２８８、２８９、２９０、または２９１に示される少なくとも１つのコンセンサス配列を含む。一部の例では、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質は、１つまたは複数の他の薬剤、例えば、１つまたは複数の細胞内局在化シグナル、１つまたは複数のエフェクタードメイン、またはこれらの組合せをさらに含む（例えば、融合タンパク質である）。一部の例では、１つまたは複数のＨＥＰＮドメインを含む少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質は、１５００ａａ以下、１２００ａａ以下、１１００ａａ以下、１０００ａａ以下、例えば、約８００～１５００ａａ、約８００～１２５０ａａ、または約８５０～９５０ａａである。

【００１１】

そのようなＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする単離された核酸分子、例えば、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ、またはｍＲＮＡもまた、提供される。そのような単離された核酸分子は、ベクター（例えば、プラスミドまたはウイルスベクター）の一部であってもよく、プロモーターまたはエンハンサーエレメント（または両方）に作動可能に連結していてもよい。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１３９、１４０、または１４１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％の配列同一性を有する。一部の例では、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする単離された核酸分子（ベクターの一部であり得る）は、真核生物細胞、例えば、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化された少なくとも１つ

のＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、例えば、配列番号１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１４２、１４３、１４４、または１４５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％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄコード配列を含む。

【００１２】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄに媒介される様式で、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子とハイブリダイズするｇＲＮＡは、１つまたは複数のダイレクトリピート（ＤＲ）配列、１つまたは複数のスペーサー配列、例えば、ＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサーのアレイを含む１つまたは複数の配列を含む。一部の例では、１つまたは複数のＤＲ配列は、配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５４、１５６、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９１、１９２、１９３、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５、２１７、２１９、２２１、２２３、２２５、２２７、２２８、２３０、２３２、２３４、２３６、２３８、２４０、２４２、２４４、２４６、２４８、２５０、２５２、または２５４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％の配列同一性を有する。１つの例では、ｇＲＮＡは、追加の配列、例えば、アプタマー配列（例えば、ＭＳ２ステムループ）を含む。

【００１３】

一部の例では、複数のｇＲＮＡが、単一のアレイから生成され、それぞれのｇＲＮＡは、異なってもよく、例えば、異なるＲＮＡを標的化してもよく、もしくは単一のＲＮＡの複数の領域を標的化してもよく、またはそれらの組合せであってもよい。

【００１４】

１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標的にする方法が、提供される。一部の例では、ＲＮＡ全体が、標的化される。一部の例では、ＲＮＡの一部分が、標的化される。ＲＮＡ分子を標的にするステップは、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を切り離すかまたはそれにニックを入れるステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を活性化するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を脱活性化するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を視覚化または検出するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標識するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を結合するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を編集するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を輸送するステップ、および１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子をマスクするステップのうちの１つまたは複数を含み得る。一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を修飾するステップは、ＲＮＡ塩基置換、ＲＮＡ塩基欠失、ＲＮＡ塩基挿入、標的ＲＮＡにおける破断、ＲＮＡのメチル化、およびＲＮＡの脱メチル化のうちの１つまたは複数を含む。

【００１５】

一部の例では、そのような方法は、疾患、例えば、ヒトにおける疾患を処置するために使用される。そのような例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子は、疾患と関連している。

【００１６】

天然に存在しないタンパク質を含む、単離されたタンパク質もまた、提供される。一部の例では、タンパク質は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６

５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６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％の配列同一性を有する。一部の例では、本開示によって包含される単離されたＣａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号１９５、１９６、１９７、２８８、２８９、２９０、または２９１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％の配列同一性を有する配列を含む。一部の例では、単離されたタンパク質は、原核生物ゲノムまたはメタゲノム、消化管メタゲノム、活性汚泥メタゲノム、嫌気性消化器メタゲノム、ニワトリ消化管メタゲノム、ヒト消化管メタゲノム、ブタ消化管メタゲノム、ウシ消化管メタゲノム、ヒツジ消化管メタゲノム、ヤギ消化管メタゲノム、カピバラ消化管メタゲノム、霊長類消化管メタゲノム、シロアリ消化管メタゲノム、糞便メタゲノム、Ｏｒｄｅｒ Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌｅｓまたは Ｆａｍｉｌｙ Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃａｃｅａｅ由来のゲノムに由来するＣａｓ１３ｄオルソログである。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄオルソログは、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ａｌｂｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｒａｅｕｍ、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ ＦＤ－１、無培養Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ ＴＳ２８－ｃ４０９５、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｂｉｃｉｒｃｕｌａｎｓ、またはＲｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ ＣＡＧ５７に由来するＣａｓ１３ｄオルソログを含む。Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、１つまたは複数の他の薬剤またはドメイン、例えば、１つまたは複数の細胞内局在化シグナル、１つまたは複数のエフェクタードメイン、またはこれらの組合せをさらに含み得る（例えば、融合タンパク質である）。

【００１７】

単離されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）分子もまた、提供される。一部の例では、単離されたｇＲＮＡは、１つまたは複数のダイレクトリピート（ＤＲ）配列、例えば、プロセシングされていない（例えば、約３６ｎｔ）またはプロセシングされたＤＲ（例えば、約３０ｎｔ）を含む。一部の例では、ＤＲは、配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５４、１５６、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９１、１９２、１９３、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５、２１７、２１９、２２１、２２３、２２５、２２７、２２８、２３０、２３２、２３４、２３６、２３８、２４０、２４２、２４４、２４６、２４８、２５０、２５２、または２５４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％の配列同一性を有する。そのようなｇＲＮＡは、標的ＲＮＡに特異的な（例えば、それに相補的な）１つまたは複数のスペーサー配列をさらに含み得る。

【００１８】

本明細書において提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質および本明細書において提供され

るｇＲＮＡを含む、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体もまた、提供される。
【００１９】
本明細書において提供される任意のＣａｓ１３ｄタンパク質（またはＣａｓ１３ｄをコードする核酸分子）、任意のｇＲＮＡ、任意のＲＮＰ複合体、または任意のベクターを含む、組換え細胞もまた、提供される。１つの例では、細胞は、細菌細胞ではない。１つの例では、細胞は、細菌細胞である。
【００２０】
本明細書において提供される任意のＣａｓ１３ｄタンパク質（またはＣａｓ１３ｄをコードする核酸分子）、任意のｇＲＮＡ、任意のＲＮＰ複合体、任意の単離された核酸分子、任意のベクター、または任意の細胞のうちの１つまたは複数を含む、組成物もまた、提供される。そのような組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。
【００２１】
キットもまた、提供される。そのようなキットは、本明細書において提供される任意のＣａｓ１３ｄタンパク質（またはＣａｓ１３ｄをコードする核酸分子）、任意のｇＲＮＡ、任意のＲＮＰ複合体、任意の単離された核酸分子、任意のベクター、任意の細胞、または任意の組成物のうちの１つまたは複数を含み得る。そのような試薬は、組み合わされていてもよく、または別個の容器に入っていてもよい。
【００２２】
本開示の上述およびその他の目的および特性は、添付の図面を参照しながら進められる以下の詳細な説明により、さらに明らかとなろう。
【図面の簡単な説明】
【００２３】
【図１Ａ】図１Ａ～１Ｂは、ＲＮＡを標的にするクラス２　ＣＲＩＳＰＲ系Ｃａｓ１３ｄの識別のための生物情報学的パイプラインを示す図である。（Ａ）ＣＲＩＳＰＲ系識別のための計算的パイプラインを記載する概略図。ＣＲＩＳＰＲリピートアレイおよび近隣タンパク質＞７５０ａａ長のみを必要とする、推定クラス２　ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座についての最低限の定義を使用した。初回の検索を、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｏｍｅに由来する原核生物ゲノムアセンブリに対して実施し、後に、予測されたオープンリーディングフレームなしの公的メタゲノム配列に対する予測されたＣａｓ１３ｄタンパク質のＴＢＬＡＳＴＮを介して拡張した。ＤＲ、ダイレクトリピート。（Ｂ）全長Ｃａｓ１３ｄエフェクターおよびメタゲノム断片の系統学的分類およびアライメント。Ｃａｓ１３ｄエフェクターおよびメタゲノムＣａｓ１３ｄタンパク質断片は、解釈を容易にするために着色したいくつかの別個の分岐へとクラスター化する。影は、Ｂｌｏｓｕｍ６２マトリックスを使用した残基保存を示す。この研究で使用した全長Ｃａｓ１３ｄエフェクターは、Ｃａｓ１３ｄファミリーの別個の分岐から試料採取した。Ｃａｓ１３ｄタンパク質およびタンパク質断片のアライメントを、ＣｌｕｓｔａｌＯｍｅｇａ　１．２．４を使用して実施し、最尤樹構築をＰｈｙＭＬ　３．２で実施した。
【図１Ｂ】同上。
【図２】図２Ａ～２Ｃは、ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ｄが、単一エフェクターＣＲＩＳＰＲリボヌクレアーゼのファミリーであることを示す図である。（Ａ）保存されたＨＥＰＮ　ＲＮａｓｅドメインと共に示された完全Ｃａｓ１３ｄ　ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座との、本明細書で使用したＣａｓ１３ｄエフェクターの最尤系統樹。灰色の矩形は、ＣＲＩＳＰＲダイレクトリピート（ＤＲ）を示し、青色の菱形は、スペーサー配列を示す。（Ｂ）無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．試料からの、異種性に発現されたＣａｓ１３ｄ遺伝子座のＲＮＡシーケンシング。ＣＲＩＳＰＲアレイにマッピングされる成熟ｇＲＮＡは、プロセシングされた３０ｎｔのＤＲおよび１４～２６ｎｔの可変性のスペーサー長を示す。ダイレクトリピート短縮のコフォールディング（co-fold）分析は、強いヘアピン構造を示す。（Ｃ）精製されたＥ．ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄおよび触媒的に死んだＣａｓ１３ｄ（ｄＣａｓ１３ｄ）タンパク質は各々、ガイドアレイをその２つの構成成分ｇＲＮＡへとプロセシングするのに十分である。ＥＤＴＡの添加は、ｇＲＮＡプロセシ

ングを損なわない。「ｄ」、ｄＣａｓ１３ｄ（Ｒ２９５Ａ、Ｈ３００Ａ、Ｒ８４９Ａ、Ｈ８５４Ａ）。

【図３Ａ－Ｂ】図３Ａ～３Ｄは、ＲＮＡを標的にするクラス２　ＣＲＩＳＰＲエフェクターの系統学的分類、およびＣａｓ１３ｄファミリー内の配列保存を示す図である。（Ａ）Ｂｌｏｓｕｍ６２に従って影を付けた保存された残基による、本明細書で使用したＣａｓ１３ｄエフェクター中のＨＥＰＮモチーフ保存。ＲｘｘｘｘＨ　ＨＥＰＮモチーフが強調される。（Ｂ）ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓファミリーの最尤樹。ＶＩ型Ｃａｓ１３スーパーファミリーエフェクターの平均アミノ酸長は、赤色で示される。以前に記載されたクラス２　ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ標的化タンパク質（Abudayyeh et al., 2017; Cox et al., 2017; East-Seletsky et al., 2017; East-Seletsky et al., 2016; Smargon et al., 2017）およびＣａｓ１３ｄエフェクターのアライメントを、ＭＡＦＦＴ　７．３８を使用して実施し、最尤樹構築をＰｈｙＭＬ　３．２で実施した。分岐標識およびスケールバーは、部位１つ当たりの置換を示す。（Ｃ）予測されたＣａｓ１３ｄダイレクトリピートＲＮＡ二次構造。（Ｄ）全長３６ｎｔのＣａｓ１３ｄダイレクトリピートの配列ロゴ。

【図３Ｃ－Ｄ】同上。

【図４】図４Ａ～４Ｃは、組換えＣａｓ１３ｄタンパク質の精製を示す図である。ＥｓＣａｓ１３ｄを、Ｎ末端Ｈｉｓ－ＭＢＰ融合物として発現させ、連続的な親和性、カチオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。Ｈｉｓ－タグを、ＴＥＶプロテアーゼ切断によって除去した。（Ａ）ＥｓＣａｓ１３ｄについてのＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００カラムからのクロマトグラム。（Ｂ）Ｅ．ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄについてのサイズ排除クロマトグラフィー画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。（Ｃ）精製されたＥ．ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄおよびｄＣａｓ１３ｄ（両方のＨＥＰＮモチーフ中の予測された触媒的残基のＲ２９５Ａ、Ｈ３００Ａ、Ｒ８４９Ａ、Ｈ８５４Ａ突然変異）のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル。

【図５】図５Ａ～５Ｄは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＣａｓ１３ｄによるプログラム可能なＲＮＡ標的化を示す図である。（Ａ）Ｅ．ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄは、相補的ｓｓＲＮＡ標的を効率的に切断するために、マッチするガイドアレイまたは成熟ｇＲＮＡを必要とする。変性ゲルは、３７℃で１時間インキュベートした切断反応を示す。ＮＴ、非標的化。（Ｂ）ｄＣａｓ１３ｄによる置換またはＥＤＴＡの添加は、ガイドおよびアレイの両方によるＣａｓ１３ｄ媒介性ＲＮＡ標的化を抑止する。「ｄ」、死んだＣａｓ１３ｄ。（Ｃ）Ｃａｓ１３ｄ切断活性のガイド－標的マッチ依存的活性化を示す変性ゲル。スクランブルされた標的ＲＮＡ（「Ａ」）は蛍光標識されるが、ガイド相補的アクチベーター標的ＲＮＡ（「Ｂ」）は未標識である。ＲＮＡ切断活性は、ガイドＲＮＡまたは相補的標的ＲＮＡの個々の除去、ならびにＥＤＴＡの添加またはＣａｓ１３ｄの触媒的不活性化（「ｄ」として示される）によって消失される。（Ｄ）Ｃａｓ１３ｄ　ＲＮａｓｅ活性のガイドおよび標的依存的活性化についてのモデル。三元Ｃａｓ１３ｄ：ｇＲＮＡ：標的ＲＮＡ複合体は、相補的標的ＲＮＡまたはバイスタンダーＲＮＡを切断することが可能である。

【図６Ａ－Ｄ】図６Ａ～６Ｈは、Ｃａｓ１３ｄ特性のｉｎ　ｖｉｔｒｏ特徴付けを示す図である。（Ａ）ｇＲＮＡスペーサー短縮の長さおよび配列、ならびに相補的ｓｓＲＮＡ標的に対するスペーサー位置を示す概略図。（Ｂ）異なるスペーサー長による標的ＲＮＡのＥｓＣａｓ１３ｄ切断活性を示す変性ゲル。（Ｃ）ｓｓＲＮＡ標的の相補的ｓｓＤＮＡバージョンをタイリングする図３Ａからの１２個のガイドと対にされたＥｓＣａｓ１３ｄ切断反応を示す変性ゲル。（Ｄ）相補的標的のｄｓＤＮＡバージョンをタイリングする同じ１２個のガイドと対にされたＥｓＣａｓ１３ｄを使用する切断反応を示す変性ゲル。（Ｅ）図３Ａからの切断効率の定量。各ＰＦＳ塩基は、相補的標的ＲＮＡをタイリングする３つの異なるスペーサー配列の平均である。切断パーセンテージは、総レーン強度によって除算した切断バンド強度の比によって決定される。平均は±ＳＤで示され、各データポイントは、独立した複製を示す。（Ｆ）インバリアントなスペーサー配列を考慮した、異なるＰＦＳ塩基を有する標的ＲＮＡのＣａｓ１３ｄ媒介性切断。Ｃａｓ１３ｄ切断効率の定

量およびＥｓＣａｓ１３ｄ切断活性を示す代表的な変性ゲルが示される。差異は有意ではない（一元配置ＡＮＯＶＡ、Ｐ＝０．７６８）。切断パーセンテージは、上記のように決定され、平均は±ＳＤで示される、ｎ＝３。（Ｇ）および（Ｈ）Ｃａｓ１３ｄ活性のための最適な温度範囲。２つの異なる標的ＲＮＡについての１６～６２℃の範囲の温度でのＥｓＣａｓ１３ｄ切断活性を示す変性ゲル。

【図６Ｅ－Ｈ】同上。

【図７】図７Ａ～７Ｂは、Ｃａｓ１３ｄ標的基質優先性の特徴付けを示す図である。（Ａ）Ｃａｓ１３ｄは、複数のガイドによって一般化可能にリプログラムされ得、プロトスペーサー隣接配列（ＰＦＳ）要求を示さない。ＥｓＣａｓ１３ｄ、および標的ＲＮＡをタイリングする１２個のガイドによるＲＮＡ切断が示される。対照レーンは、並行した別々のゲル泳動からのものである。（Ｂ）Ｃａｓ１３ｄは、合成を可能にするために、ヘアピンのループまたは５ｎｔ毎にトランジション突然変異（Ｘ）が割り込む直鎖ホモポリマーリピート中のウラシル塩基を優先的に切断する。

【図８】図８Ａ～８Ｄは、ヒト細胞における操作されたＣａｓ１３ｄオルソログのＲＮＡノックダウン活性スクリーニングを示す図である。（Ａ）操作されたＣａｓ１３ｄエフェクターおよびガイドをコードする哺乳動物発現構築物の概略図。ＮＬＳ、核局在化シグナル。プレｇＲＮＡ、２つの全長３６ｎｔのＤＲが隣接する単一の３０ｎｔのスペーサー配列を含有する、人工のプロセシングされていないガイドＲＮＡ。ｇＲＮＡ、単一の３０ｎｔのプロセシングされたＤＲおよび２２ｎｔのスペーサー配列を有する、予測された成熟ガイドＲＮＡ。（Ｂ）４つのプレｇＲＮＡまたはｇＲＮＡのプールを使用した、ヒトＨＥＫ２９３ＦＴ細胞でのＣａｓ１３ｄオルソログ活性スクリーニングにおけるｍＣｈｅｒｒｙタンパク質ノックダウンのヒートマップ。標準化されたＭＦＩ、非標的化条件と比較した中央値蛍光強度。灰色の位置は試験しなかった、ｎ＝３。（Ｃ）操作された構築物の局在化および発現を示すＣａｓ１３ｄの免疫細胞化学。スケールバー、１０μｍ。青色の疑似カラー、核のＤＡＰＩ染色。（Ｄ）内因性Ｂ４ＧＡＬＮＴ１　ｍＲＮＡのノックダウンについてのＡｄｍＣａｓ１３ｄ（配列番号１４３）およびＲｆｘＣａｓ１３ｄ（配列番号２８０）オルソログ構築物の比較により、ＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ（ＣａｓＲｘ；配列番号２８０）が、両方のガイドＲＮＡアーキテクチャーについて最も有効であることが明らかである。４つのガイドのプールを標的化に使用した。ＮＴ、非標的化。値は平均±ＳＥＭである、ｎ＝３。

【図９Ａ－Ｄ】図９Ａ～９Ｈは、ＣａｓＲｘが、多様なヒトのコードおよび非コード転写物の効率的かつ特異的なノックダウンを媒介することを示す図である。（Ａ）標的転写物をタイリングする複数のガイドＲＮＡは、単一のアレイとして発現され、ＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ（ＣａｓＲｘ；配列番号２８０）によって、同じ細胞内で個々のｇＲＮＡへとプロセシングされ得る。（Ｂ）４つのガイドのアレイは各々、一過的トランスフェクションを介して、２９３ＦＴ細胞においてＣａｓＲｘによる標的ノックダウンを媒介する。ＧＦＰビヒクル対照と比較したノックダウンを、ｑＰＣＲによって決定した、ｎ＝３。（Ｃ）ＣａｓＲｘ標的配列およびスペーサー位置がマッチしたｓｈＲＮＡの概略図。（Ｄ）個々の位置がマッチしたｓｈＲＮＡおよびＣａｓＲｘ　ｇＲＮＡによる相対的標的ＲＮＡノックダウン。ＮＴ、非標的化。ＣＲＩＳＰＲｉ、転写抑制のためのｄＣａｓ９媒介性ＣＲＩＳＰＲ干渉（ｎ＝３）。（Ｅ）ＲＮＡシーケンシングによって決定した、Ｂ４ＧＡＬＮＴ１標的化ｓｈＲＮＡと非標的化（ＮＴ）ｓｈＲＮＡとの間の差次的転写物レベルのＶｏｌｃａｎｏプロット（ｎ＝３）。５４２個の非特異的転写物変化が識別された。（Ｆ）Ｂ４ＧＡＬＮＴ１標的化ＣａｓＲｘと非標的化（ＮＴ）ガイドとの間の差次的転写物レベルのＶｏｌｃａｎｏプロット。標的化ガイド位置は、（Ｅ）に示されるｓｈＲＮＡとマッチしている。Ｂ４ＧＡＬＮＴ１は、顕著な変化を示した唯一の転写物であった、ｎ＝３。（Ｇ）マッチしたｓｈＲＮＡおよびＣａｓＲｘガイドによる顕著なオフターゲット転写物撹乱の概要。（Ｈ）２９３ＦＴ細胞における、各々３つのガイドおよび１つの非標的化（ＮＴ）ガイドを用いた、１１個の内因性転写物のＣａｓＲｘ標的化。転写物レベルは、ＧＦＰビヒクル対照との比較である、平均±ＳＥＭ、ｎ＝３。

【図９Ｅ－Ｈ】同上。
【図１０】図１０Ａ～１０Ｄは、標的化されたノックダウンおよびスプライシングについての、操作されたＣａｓ１３スーパーファミリーエフェクターの比較を示す図である。（Ａ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞における、ＣａｓＲｘ、ＮＬＳ－ＬｗａＣａｓ１３ａ－ｍｓｆＧＦＰ（Abudayyeh et al., 2017）およびＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＮＥＳ（Cox et al., 2017）についての、個々の位置がマッチしたｇＲＮＡによる相対的標的ＲＮＡノックダウン。ＮＴ、非標的化。値は平均±ＳＥＭである、ｎ＝３。（Ｂ）Ｃａｓ１３中央値ノックダウン効率の比較。ガイドＲＮＡ１つ当たりｎ＝３。＊＊＊＊は、フリードマン検定に従ってＰ＜０．０００１を示す。（Ｃ）二色（bichromatic）スプライシングレポーターによる、触媒的に不活性なＮＬＳ－ｄＣａｓ１３ａ－ｍｓｆＧＦＰによるエクソン排除。ガイドは、ＣａｓＲｘについて図６Ｂ中に報告されるものと位置がマッチしている。値は平均±ＳＥＭである、ｎ＝３。（Ｄ）ＮＬＳ－ｄＣａｓ１３ａ－ｍｓｆＧＦＰおよびＣａｓＲｘによるスプライシングモジュレーションの比較。非標的化ガイドと比較した、標的化されたエクソン排除における倍数の変化が示される。＊＊＊＊は、二元配置ＡＮＯＶＡに従ってＰ＜０．０００１を示す。
【図１１】図１１Ａ～１１Ｂは、ヒト細胞におけるＡＮＸＡ４のＣａｓＲｘおよびｓｈＲＮＡ標的化からのＲＮＡシーケンシングを示す図である。（Ａ）ＲＮＡシーケンシングによって決定した、ＡＮＸＡ４標的化ｓｈＲＮＡと非標的化（ＮＴ）ｓｈＲＮＡとの間の差次的転写物レベルのＶｏｌｃａｎｏプロット（ｎ＝３）。９１５個の非特異的転写物変化が識別された。（Ｂ）（Ａ）に示されるｓｈＲＮＡにマッチしたガイド位置を含有する、図９Ｂにおいて使用したＡＮＸＡ４標的化ＣａｓＲｘアレイおよび非標的化（ＮＴ）アレイについての差次的転写物レベルのＶｏｌｃａｎｏプロット。ＡＮＸＡ４は、顕著な下方調節を示した唯一の転写物であった、ｎ＝３。ＨＩＳＴ２ＨＢＥは、顕著な上方調節を示すことが識別された唯一の転写物であった。Ｈ２Ｂは、ＡＮＸＡ４と相互作用することが示された（Yang et al., 2010）Ｈ２ＡＸのダイマーパートナーである（Du et al., 2006）。
【図１２Ａ－Ｃ】図１２Ａ～１２Ｆは、選択的スプライシングを操作するための、触媒的に不活性なｄＣａｓＲｘスプライスエフェクターのＡＡＶ送達を示す図である。（Ａ）二色エクソンスキッピングレポーターの概略図。＋１および＋３、リーディングフレーム。ＢＰ、イントロン分岐点標的化ガイド。ＳＡ、スプライスアクセプター部位重複ガイド。ＥＸ、エクソンガイド。ＳＤ、スプライスドナー部位重複ガイド。ＡＵＧ、開始コドン。ＵＧＡ、停止コドン。２番目のエクソンの包含は、ｄｓＲｅｄのフレームを外れた（＋３）非蛍光翻訳と、その後のインフレームのｍＴａｇＢＦＰ２とをもたらす。標的化されたエクソンの排除は、ｄｓＲｅｄのインフレーム翻訳（＋１）と、その後の停止コドンとをもたらす。（Ｂ）プレｍＲＮＡに標的化されたｄＣａｓＲｘおよびＮ末端ｈｎＲＮＰａ１－ｄＣａｓＲｘ融合タンパク質によって誘導されたエクソン排除。ｈｎＲＮＰａ１のＧｌｙ－リッチＣ末端ドメインは、エフェクタードメインとして使用される。エクソンスキッピング効率は、フローサイトメトリーを介して決定される、ｄｓＲｅｄまたはＢＦＰアイソフォームを主に有する細胞の相対的パーセンテージとして示される。ＮＬＳ、核局在化シグナル。「Ａ」、４つ全てのガイドを有するＣＲＩＳＰＲアレイ。値は平均±ＳＥＭである、ｎ＝３。（Ｃ）ＡＡＶ末端逆位配列（ＩＴＲ）を含め、総導入遺伝子サイズ＜４．３ｋｂを有する、ｄＣａｓＲｘおよび３ガイドアレイを有するＡＡＶ設計。（Ｄ）前頭側頭葉型認知症（ＦＴＤ）疾患モデル化の概略図。ニューロンは、患者由来ｉＰＳＣおよび対照ｉＰＳＣの、ニューログニン－２（Ｎｇｎ２）により指示された分化と、ｄＣａｓＲｘまたはビヒクル対照ＡＡＶ（ＥＦＳ－ｍＴａｇＢＦＰ２）によるその後の形質導入とを介して生成される。（Ｅ）ＦＴＤは、タウをコードするＭＡＰＴ転写物のエクソン１０の後ろの、推定イントロンスプライスエンハンサー中のＳＮＰと関連する。ＭＡＰＴエクソン１０の選択的スプライシングは、４Ｒタウ（包含による）および３Ｒタウ（排除による）を生じる。示されたＩＶＳ１０＋１６突然変異を含むイントロンスプライスエンハンサー中のＳＮＰは、増加したエクソン包含およびより高いレベルの４Ｒタウを生じる。４Ｒ

タウレベルの低減を促進するために、ｄＣａｓＲｘアレイ中に含有されるｇＲＮＡを、エクソン１０スプライスアクセプター（ｇ１）ならびに紫色で示される２つの推定エクソンスプライスエンハンサー（ｇ２、ｇ３）に対して標的化した。（Ｆ）分化したニューロンにおける相対的４Ｒ／３Ｒタウ転写物比を、ＡＡＶによる形質導入の１４日後に、ｑＰＣＲを介してアッセイした。ＦＴＤ、ＩＶＳ　１０＋１６を有する前頭側頭葉型認知症細胞。値は平均±Ｓ．Ｄ．である、ｎ＝３。＊＊＊＊は、Ｐ＜０．０００１を示す。

【図１２Ｄ－Ｆ】同上。

【図１３】図１３は、開示された方法を使用したヒト細胞におけるＲＮＡ標的化を示す棒グラフである。

【図１４】図１４は、開示されたＣａｓ１３ｄおよびＤＲをどのように使用して選択的スプライシングを達成できるかを示す概略図である。

【図１５】図１５Ａ～１５Ｄは、以下を示す一連のパネルである：（Ａ）Ｃａｓ１３ｄは、ガイドＲＮＡのスペーサー配列とマッチする標的を結合した際に、活性なＲＮａｓｅ複合体へと変換される。これは、ｇＲＮＡ相補的標的ＲＮＡまたは非相補的バイスタンダーＲＮＡを切断することが可能である。（Ｂ）Ｃａｓ１３ｄ標的依存的ＲＮａｓｅ活性は、例えば、Ｃａｓ１３ｄガイドＲＮＡのスペーサーとマッチする標的の存在下でのみ切断される標識された検出用ＲＮＡの切断を介して、検出可能なシグナルへと変換され得る。この例では、検出用ＲＮＡは、フルオロフォア「Ｆ」および蛍光を消失させるクエンチャー「Ｑ」を含有する。フルオロフォアがクエンチャーから遊離され、蛍光が生成されるのは、バイスタンダーＲＮＡ切断の際のみである。（Ｃ）Ｅ．ｓｉｒａｅｕｍ由来のＣａｓ１３ｄは、完全にマッチした標的の存在下でのみ可視シグナルを生じ、異なるミスマッチした標的の存在下では可視シグナルを生じない。（Ｄ）Ｒ．ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２由来のＣａｓ１３ｄは、完全にマッチした標的の存在下でのみ可視シグナルを生じ、異なるミスマッチした標的の存在下では可視シグナルを生じない。

【図１６Ａ】図１６Ａ～１６Ｂ：（Ａ）７つのオルソログのアライメントは、高い（緑色の棒）および低い（赤色の棒）保存を有する領域を示す。欠失のために選択された領域は、１～１０とマークされる。（Ｂ）全長ＣａｓＲｘおよびＣａｓＲｘ欠失バリアントのノックダウン（上）およびスプライシング（下）活性。欠失バリアント５は、完全活性を保持することが示され、これは、完全活性を保持したままで低い保存のエリアを欠失させることの実現可能性を実証している。

【図１６Ｂ】同上。

【図１７】図１７Ａおよび１７Ｂは、細菌細胞におけるｃｃｄＢの標的化を示す図である。（Ａ）ｃｃｄＢを発現する細菌細胞中に導入した構築物、および（Ｂ）種々の条件下でのｃｃｄＢの相対的発現。

【図１８Ａ】図１８Ａ～１８ＭＭＭは、５３個の異なるＣａｓ１３ｄタンパク質（上から下に、配列番号２９３、１８３、１８９、２２０、２１８、２２２、２２９、２１６、１７７、２００、１３９、１７９、２０８、１６６、１８５、２０２、２３９、２９４、２４９、２１０、２４３、２１２、１７５、１６４、１６０、２９５、２９６、１８７、２４１、１４０、１６２、１５５、２０６、１８１、２３１、１２８、１９８、２３７、２３３、２５３、２１４、２２４、１２７、２３５、１５３、１２５、２４５、２４７、２０４、２２６、３、１２６および１４９）のアライメントを示す図である。

【図１８Ｂ】同上。

【図１８Ｃ】同上。

【図１８Ｄ】同上。

【図１８Ｅ】同上。

【図１８Ｆ】同上。

【図１８Ｇ】同上。

【図１８Ｈ】同上。

【図１８Ｉ】同上。

【図１８Ｊ】同上。

【図１８Ｋ】同上。
【図１８Ｍ】同上。
【図１８Ｎ】同上。
【図１８Ｌ】同上。
【図１８Ｏ】同上。
【図１８Ｐ】同上。
【図１８Ｑ】同上。
【図１８Ｒ】同上。
【図１８Ｓ】同上。
【図１８Ｔ】同上。
【図１８Ｕ】同上。
【図１８Ｖ】同上。
【図１８Ｗ】同上。
【図１８Ｘ】同上。
【図１８Ｙ】同上。
【図１８Ｚ】同上。
【図１８ＡＡ】同上。
【図１８ＢＢ】同上。
【図１８ＣＣ】同上。
【図１８ＤＤ】同上。
【図１８ＥＥ】同上。
【図１８ＦＦ】同上。
【図１８ＧＧ】同上。
【図１８ＨＨ】同上。
【図１８ＩＩ】同上。
【図１８ＪＪ】同上。
【図１８ＫＫ】同上。
【図１８ＭＭ】同上。
【図１８ＮＮ】同上。
【図１８ＬＬ】同上。
【図１８ＯＯ】同上。
【図１８ＰＰ】同上。
【図１８ＱＱ】同上。
【図１８ＲＲ】同上。
【図１８ＳＳ】同上。
【図１８ＴＴ】同上。
【図１８ＵＵ】同上。
【図１８ＶＶ】同上。
【図１８ＷＷ】同上。
【図１８ＸＸ】同上。
【図１８ＹＹ】同上。
【図１８ＺＺ】同上。
【図１８ＡＡＡ】同上。
【図１８ＢＢＢ】同上。
【図１８ＣＣＣ】同上。
【図１８ＤＤＤ】同上。
【図１８ＥＥＥ】同上。
【図１８ＦＦＦ】同上。
【図１８ＧＧＧ】同上。
【図１８ＨＨＨ】同上。

【図１８ＩＩＩ】同上。
【図１８ＪＪＪ】同上。
【図１８ＫＫＫ】同上。
【図１８ＭＭＭ】同上。
【図１９Ａ】図１９Ａは、ノックダウン効率およびエフェクターの遺伝子サイズによってプロットした、ｍＣｈｅｒｒｙレポーターアッセイを介した、ヒト細胞におけるノックダウンについてのＮＬＳ（配列番号２５および２５６）およびＮＥＳアーキテクチャー（配列番号２８７）を有する５０個のＣａｓ１３ｄオルソログ（表１を参照のこと）をスクリーニングした結果を示すプロットである。オルソログのサブセット（Ｇａ０５３１－ＮＬＳ、Ｇａ７２７４－ＮＬＳおよびｋ８７－ＮＥＳ、それぞれ、配列番号２３５、１９８および１８９）のみが、ＣａｓＲｘバリアント（配列番号２８０）と匹敵する活性を示す。
【図１９Ｂ】図１９Ｂは、ＮＬＳおよびＮＥＳ細胞内局在化シグナルを有する複数のＣａｓ１３ｄオルソログによる、ヒトＨＥＫ２９３ＦＴ細胞における内因性ＣＤ８１のノックダウンを示す棒グラフである。ｍＣｈｅｒｒｙレポーターアッセイからの最も活性なオルソログ（表１を参照のこと）を、第２のラウンドの活性スクリーニングのために選択した。ＣＤ８１ノックダウンを、細胞表面フローサイトメトリーを介して評価した。ＣａｓＲｘバリアントＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ（配列番号２８０）は、最も高いレベルのノックダウンを示し、一部のさらなるオルソログは、この内因性標的に対して＞７５％のノックダウンを示した。
【図２０】図２０は、内因性ＣＤ８１タンパク質のノックダウンについての、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＮＥＳ（Cox et al., Science. 2017 Nov 24;358(6366):1019-1027）に対するＣａｓＲｘ（配列番号２８０；ＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ設計）の用量応答比較を示す棒グラフである。ＣａｓＲｘは、等価なタンパク質レベルにおいて顕著により高い活性を示し（Ｃａｓ１３－ＧＦＰ発現によって測定される）、これは、酵素１単位当たりのより高い活性、およびしたがって、生物学的／治療的に適切なレベルのノックダウンに達するためのより低い必要用量を示している。さらに、ＣａｓＲｘは、ＰｓｐＣａｓ１３ｂよりも顕著に小さい。小さいサイズ、およびより低い用量での高い活性は、ＣａｓＲｘを、治療的送達にとって有用なものにする。読み出しは、ヒトＨＥＫ２９３ＦＴ細胞における一過的トランスフェクションの３日後である。
【図２１】図２１は、Ｃａｓ１３ｄオルソログＣａｓＲｘおよびＧａ０５３１の複数の操作された欠失が、ヒトＨＥＫ２９３ＦＴ細胞においてノックダウン活性を維持することを示す棒グラフである。
【図２２】図２２は、ｄＣａｓ１３ｄバリアント（標的ＲＮＡ切断を消失させる、突然変異したＨＥＰＮドメインを有する）が、本発明者らの二色の青対赤のスプライスレポーターのスプライスアクセプター部位に標的化されて、エクソン排除（ｍＴａｇＢＦＰ２発現における低減によって測定される）を媒介したことを示す棒グラフである。高レベルの内因性タンパク質ノックダウン（＞７０％のＣＤ８１タンパク質ノックダウン）を有するオルソログについてさえ、スプライシングモジュレーションは、非効率的であり得る。これは、ある特定のＣａｓ１３ｄオルソログ、例えばＣａｓＲｘ、および短縮型ＣａｓＲｘバリアント、例えばＣａｓＲｘ－ｄｅｌ１３の、高いノックダウンおよび高いスプライシングモジュレーション活性の独自に有利な組合せを強調する。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞中へのｄＣａｓ１３ｄバリアントの一過的トランスフェクションの３日後のフローサイトメトリーによるスプライシング読み出し。
【図２３】図２３Ａ～２３Ｃは、Ｃａｓ１３ｄを用いたＲＮＡ編集を示す図である。（Ａ）ｄＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＡＤＡＲ２エフェクター融合物および不活性化されたＧＦＰレポーターの概略図。（Ｂ）ＧＦＰレポーター中の成熟前停止コドンの標的化されたＡからＩへのＲＮＡ編集は、ＧＦＰ発現を再活性化する。非標的化ガイドは、ＲＮＡ編集をもたらさない。（Ｃ）Ｃａｓ１３ｄ媒介性ＲＮＡ編集効率の定量。
【発明を実施するための形態】
【００２４】

配列表

添付の配列表に列挙されている核酸配列およびアミノ酸配列は、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．１．８２２に定義されるように、ヌクレオチド塩基については標準的な略字およびアミノ酸については３文字コードを使用して示されている。それぞれの核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、相補鎖は、提示された鎖に対する任意の参照により含まれると理解される。配列表は、２０１８年８月２２日に作成された０．９９ＭＢのＡＳＣＩＩテキストファイルとして提出されており、参照により本明細書に組み込まれる。添付の配列表においては、以下の通りである。

配列番号１は、ＨＥＰＮ部位を含有するＥｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号２は、変異型ＨＥＰＮ部位を含有するＥｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号３は、ＨＥＰＮ部位を含有する無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号４は、変異型ＨＥＰＮ部位を含有する無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号５は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ２７９１０００５４９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号６は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ８５５０００３１７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号７は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ３３８９０００００２７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ８０６１０００１７０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号９は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１５０９０００２９９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１０は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ９５４９０００５９１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１１は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７１０００５００に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１２は、ヒト消化管メタゲノムに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１３は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ３９１５０００３５７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１４は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ４７１９０００１７３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１５は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６９２９０００４６８に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１６は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７３６７０００４８６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１７は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７９３０００００４０３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ９９３０００５２７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号１９は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６５５２０００６３９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号２０は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１１９３２０００２４６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号２１は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１２９６３０００２８６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号２２は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ２９５２０００４７０に

由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号２３は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ４５１０００３９４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号２４は、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ＿ｓｉｒａｅｕｍ＿ＤＳＭ＿１５７０２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号２５は、ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１９Ｅ０ｋ２１２０１４０９２０，＿ｃ３６９０００００３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号２６は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７５９３０００３６２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号２７は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１２６１９０００００５５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号２８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１４０５０００１５１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号２９は、Ｃｈｉｃｋｅｎ＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃ２９８４７４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３０は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１５１６０００２２７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３１は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１８３８０００３１９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３２は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１３１２３０００２６８に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３３は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ５２９４０００４３４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３４は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６４１５０００１９２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３５は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６１４４０００３００に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３６は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ９１１８０００００４１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３７は、Ａｃｔｉｖａｔｅｄ＿ｓｌｕｄｇｅ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ＿１２４４８６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１３２２０００４３７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号３９は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ４５８２０００５３１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４０は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ９１９０００２８３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４１は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１７０９０００５１０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４２は、ＨＥＰＮドメインを有するＭ２４＿（ＬＳＱＸ０１２１２４８３＿Ａｎａｅｒｏｂｉｃ＿ｄｉｇｅｓｔｅｒ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４３は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ３８３３０００４９４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４４は、Ａｃｔｉｖａｔｅｄ＿ｓｌｕｄｇｅ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ＿１１７３５５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４５は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１１０６１０００３３０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４６は、ヒツジ消化管メタゲノムに由来するＧｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ３３８０００３２２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号４７は、ヒト消化管メタゲノムに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ９５３０００００９７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号４９は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１７５０００００２５８に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５０は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ５３７７０００２７４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５１は、ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１９Ｅ０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ２４８０００００８９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５２は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１１４０００００００３１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５３は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７９４０００００１９１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５４は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６０４９０００２５１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５５は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１１３７０００５００に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５６は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ９３６８０００１０５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５７は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ５４６０００２７５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７２１６０００５７３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号５９は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ４８０６０００４０９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６０は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１０７６２０００４８０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６１は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ４１１４０００３７４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６２は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ＿ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ＿ＦＤ１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６３は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７０９３０００１７０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６４は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１１１１３０００３８４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６５は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６４０３０００２５９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６６は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６１９３０００１２４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６７は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７２１０００６１９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１６６６０００２７０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号６９は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ２００２０００４１１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７０は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ＿ａｌｂｕｓに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７１は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１３５５２０００３１１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７２は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１００３７０００５２７

に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７３は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ２３８０００３２９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７４は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ２６４３０００４９２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７５は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ８７４０００００５７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７６は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ４７８１０００４８９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７７は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１２１４４０００３５２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ５５９０００００４４８に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号７９は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ９２６９０００００３１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８０は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ８５３７０００５２０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８１は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１８４５０００１３０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８２は、ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１３Ｅ０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ３０００００７２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８３は、ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１Ｅ０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ１０００００７８に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８４は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１２９９０００００９９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８５は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ５２５０００３４９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８６は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７２２９０００３０２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８７は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ３２２７０００３４３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８８は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ７０３０００４６９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号８９は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ５１４９０００００６８に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９０は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ４００２０００４５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９１は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ１０４２０００００４４６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９２は、ｎｅｗ＿ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ，＿ｓｔｒａｉｎ＿ＸＰＤ３００２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９３は、Ｍ２６＿Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６９８０００３０７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９４は、Ｍ３６＿Ｕｎｃｕｌｔｕｒｅｄ＿Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ＿ｓｐ＿ＴＳ２８＿ｃ４０９５６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９５は、Ｍ１２＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ２５Ｃ０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ１３４０００００６６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９６は、ヒト消化管メタゲノムに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９７は、Ｍ１０＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ２５Ｃ９０ｋ２１２０１４０９２０，＿ｃ２８０００００４１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。

配列番号９８は、Ｍ１１＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ２５Ｃ７ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ４０７８０００１０５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号９９は、ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ２５Ｃ０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ３２０００００４５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１００は、Ｍ１３＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ２３Ｃ７ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ３０００００６７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１０１は、Ｍ５＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１８Ｅ９０ｋ２１２０１４０９２０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１０２は、Ｍ２１＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１８Ｅ０ｋ２１２０１４０９２０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１０３は、Ｍ７＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ３８Ｃ７ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ４８４１０００００３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１０４は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ＿ｂｉｃｉｒｃｕｌａｎｓに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１０５は、例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１０６は、例示的なＣａｓ１３ｄコンセンサス配列である。
配列番号１０７は、Ｍ１８＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ２２Ｅ０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ３３９５０００００７８に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１０８は、Ｍ１７＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ２２Ｅ９０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ１１４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１０９は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ＿ｓｐ＿ＣＡＧ５７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１１０は、ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１１Ｅ９０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ４３０００１２３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１１１は、Ｍ６＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１３Ｅ９０ｋ２１２０１４０９２０＿ｃ７０００００９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１１２は、Ｍ１９＿ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１７Ｅ９０ｋ２１２０１４０９２０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１１３は、ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿Ｐ１７Ｅ０ｋ２１２０１４０９２０，＿ｃ８７０００００４３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１１４は、例示的なヒトコドン最適化Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１１５は、変異体ＨＥＰＮドメインを有する例示的なヒトコドン最適化Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１１６は、Ｎ末端ＮＬＳを有する例示的なヒトコドン最適化Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１１７は、Ｎ末端およびＣ末端ＮＬＳタグを有する例示的なヒトコドン最適化Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１１８は、例示的なヒトコドン最適化無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１１９は、変異体ＨＥＰＮドメインを有する例示的なヒトコドン最適化無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２０は、Ｎ末端ＮＬＳを有する例示的なヒトコドン最適化無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２１は、Ｎ末端およびＣ末端ＮＬＳタグを有する例示的なヒトコドン最適化無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２２は、例示的なヒトコドン最適化無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＦＤ１　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２３は、変異型ＨＥＰＮドメインを有する例示的なヒトコドン最適化無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＦＤ１　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列で

ある。
配列番号１２４は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｂｉｃｉｒｃｕｌａｎｓに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２５は、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２６は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＦＤ１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２７は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ａｌｂｕｓに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２８は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＸＰＤに由来する例示的なＣａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１２９は、Ｅ．ｓｉｒａｅｕｍ　Ｃａｓ１３ｄの例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である。
配列番号１３０は、Ｒｕｍ．Ｓｐ．Ｃａｓ１３ｄの例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である。
配列番号１３１は、Ｒｕｍ．Ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２　Ｃａｓ１３ｄおよびＣａｓＲｘの例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である。
配列番号１３２～１３７は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である。
配列番号１３８は、７つの全長Ｃａｓ１３ｄオルソログの例示的な５０％コンセンサス配列である。
配列番号１３９は、消化管メタゲノムＰ１Ｅ０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１４０は、嫌気性消化器に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１４１は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＣＡＧ：５７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１４２は、例示的なヒトコドン最適化無培養消化管メタゲノムＰ１Ｅ０　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１４３は、例示的なヒトコドン最適化嫌気性消化器Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１４４は、例示的なヒトコドン最適化Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＸＰＤ　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１４５は、例示的なヒトコドン最適化Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ａｌｂｕｓ　Ｃａｓ１３ｄ核酸配列である。
配列番号１４６は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＣＡＧ：５７　ＣＲＩＳＰＲアレイの例示的なプロセシングである。
配列番号１４７は、コンティグｅｍｂ｜ＯＢＶＨ０１００３０３７．１、ヒト消化管メタゲノム配列に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である（ＷＧＳコンティグｅｍｂ｜ＯＢＸＺ０１０００００９４．１｜およびｅｍｂ｜ＯＢＪＦ０１０００００３３．１においても見出される。
配列番号１４８は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１４７に付随する）。
配列番号１４９は、コンティグｔｐｇ｜ＤＢＹＩ０１０００００９１．１｜（ウシ消化管メタゲノムからアセンブリした無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＵＢＡ１１９０）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１５０～１５２は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１４９に付随する）。
配列番号１５３は、コンティグｔｐｇ｜ＤＪＸＤ０１０００００２．１｜（無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓアセンブリ、ＵＢＡ７０１３、ヒツジ消化管メタゲノム由来）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１５４は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１５３に付随す

る）。
配列番号１５５は、コンティグＯＧＺＣ０１０００６３９．１（ヒト消化管メタゲノムアセンブリ）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１５６～１７７は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１５５に付随する）。
配列番号１５８は、コンティグｅｍｂ｜ＯＨＢＭ０１０００７６４．１（ヒト消化管メタゲノムアセンブリ）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１５９は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１５８に付随する）。
配列番号１６０は、コンティグｅｍｂ｜ＯＨＣＰ０１０００００４４．１（ヒト消化管メタゲノムアセンブリ）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１６１は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１６０に付随する）。
配列番号１６２は、コンティグｅｍｂ｜ＯＧＤＦ０１００８５１４．１｜（ヒト消化管メタゲノムアセンブリ）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１６３は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１６２に付随する）。
配列番号１６４は、コンティグｅｍｂ｜ＯＧＰＮ０１００２６１０．１（ヒト消化管メタゲノムアセンブリ）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１６５は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１６４に付随する）。
配列番号１６６は、コンティグＮＦＩＲ０１０００００８．１（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ．Ａｎ３、ニワトリ消化管メタゲノム由来）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１６７は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１６６に付随する）。
配列番号１６８は、コンティグＮＦＬＶ０１０００００９．１（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ．Ａｎ１１、ニワトリ消化管メタゲノム由来）に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１６９は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１６８に付随する）。
配列番号１７１～１７４は、例示的なＣａｓ１３ｄモチーフ配列である。
配列番号１７５は、コンティグＯＪＭＭ０１００２９００ヒト消化管メタゲノム配列に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１７６は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１７５に付随する）。
配列番号１７７は、コンティグＯＤＡＩ０１１６１１２７４．１消化管メタゲノム配列に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１７８は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１７７に付随する）。
配列番号１７９は、コンティグＯＩＺＸ０１０００４２７．１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１８０は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１７９に付随する）。
配列番号１８１は、コンティグｅｍｂ｜ＯＣＶＶ０１２８８９１４４．１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１８２は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１８１に付随する）。
配列番号１８３は、コンティグＯＣＴＷ０１１５８７２６６．１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。

配列番号１８４は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１８３に付随する）。
配列番号１８５は、コンティグｅｍｂ｜ＯＧＮＦ０１００９１４１．１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１８６は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１８５に付随する）。
配列番号１８７は、コンティグｅｍｂ｜ＯＩＥＮ０１００２１９６．１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１８８は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１８７に付随する）。
配列番号１８９は、コンティグｅ－ｋ８７＿１１０９２７３６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１９０～１９３は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１８９に付随する）。
配列番号１９４は、Ｇｕｔ＿ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅ＿ｃｏｎｔｉｇ６８９３０００２９１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄ配列である。
配列番号１９５～１９７は、例示的なＣａｓ１３ｄモチーフ配列である。
配列番号１９８は、Ｇａ０２２４４１５＿１０００７２７４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号１９９は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号１９８に付随する）。
配列番号２００は、ＥＭＧ＿１０００３６４１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２０１は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２００に付随する）。
配列番号２０２は、Ｇａ０１２９３０６＿１０００７３５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２０３は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２０２に付随する）。
配列番号２０４は、Ｇａ０１２９３１７＿１００８０６７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２０５は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２０４に付随する）。
配列番号２０６は、Ｇａ０２２４４１５＿１００４８７９２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２０７は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２０６に付随する）。
配列番号２０８は、１６０５８２９５８　＿ｇｅｎｅ４９８３４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２０９は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２０８に付随する）。
配列番号２１０は、２５０ｔｗｉｎｓ＿３５８３８＿ＧＬ０１１０３００に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２１１は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２１０に付随する）。
配列番号２１２は、２５０ｔｗｉｎｓ＿３６０５０＿ＧＬ０１５８９８５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２１３は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２１２に付随する）。
配列番号２１４は、３１００９＿ＧＬ００３４１５３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタ

ンパク質配列である。
配列番号２１５は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２１４に付随する）。
配列番号２１６は、５３０３７３＿ＧＬ００２３５８９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２１７は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２１６に付随する）。
配列番号２１８は、ＢＭＺ－１１Ｂ＿ＧＬ００３７７７１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２１９は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２１８に付随する）。
配列番号２２０は、ＢＭＺ－１１Ｂ＿ＧＬ００３７９１５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２２１は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２２０に付随する）。
配列番号２２２は、ＢＭＺ－１１Ｂ＿ＧＬ００６９６１７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２２３は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２２２に付随する）。
配列番号２２４は、－ＤＬＦ０１４＿ＧＬ００１１９１４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２２５は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２２４に付随する）。
配列番号２２６は、ＥＹＺ－３６２Ｂ＿ＧＬ００８８９１５に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２２７～２２８は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２２６に付随する）。
配列番号２２９は、Ｇａ００９９３６４＿１００２４１９２に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２３０は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２２９に付随する）。
配列番号２３１は、Ｇａ０１８７９１０＿１０００６９３１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２３２は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２３１に付随する）。
配列番号２３３は、Ｇａ０１８７９１０＿１００１５３３６に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２３４は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２３３に付随する）。
配列番号２３５は、Ｇａ０１８７９１０＿１００４０５３１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２３６は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２３５に付随する）。
配列番号２３７は、Ｇａ０１８７９１１＿１００６９２６０に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２３８は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２３７に付随する）。
配列番号２３９は、ＭＨ０２８８＿ＧＬ００８２２１９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２４０は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２３９に付随す

る）。
配列番号２４１は、Ｏ２．ＵＣ２９－０＿ＧＬ００９６３１７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２４２は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２４１に付随する）。
配列番号２４３は、ＰＩＧ－０１４＿ＧＬ０２２６３６４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２４４は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２４３に付随する）。
配列番号２４５は、ＰＩＧ－０１８＿ＧＬ００２３３９７に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２４６は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２４５に付随する）。
配列番号２４７は、ＰＩＧ－０２５＿ＧＬ００９９７３４に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２４８は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２４７に付随する）。
配列番号２４９は、ＰＩＧ－０２８＿ＧＬ０１８５４７９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２５０は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２４９に付随する）。
配列番号２５１は、－Ｇａ０２２４４２２＿１０６４５７５９に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２５２は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２５１に付随する）。
配列番号２５３は、ＯＤＡＩキメラに由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２５４は、例示的なコンセンサスＤＲ核酸配列である（配列番号２５３に付随する）。
配列番号２５５は、ＨＥＰＮモチーフである。
配列番号２５６および２５７は、それぞれ、例示的なＣａｓ１３ｄ核局在化シグナルのアミノ酸配列および核酸配列である。
配列番号２５８および２６０は、それぞれ、例示的なＳＶ４０大型Ｔ抗原核局在化シグナルのアミノ酸配列および核酸配列である。
配列番号２５９は、ｄＣａｓ９標的配列である。
配列番号２６１は、ｃｃｄＢを標的にする人工Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ　ｎＣａｓ１アレイである。
配列番号２６２は、全長３６ｎｔダイレクトリピートである。
配列番号２６３～２６６は、スペーサー配列である。
配列番号２６７は、ｃｃｄＢを標的にする人工無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ｎＣａｓ１アレイである。
配列番号２６８は、全長３６ｎｔダイレクトリピートである。
配列番号２６９～２７２は、スペーサー配列である。
配列番号２７３は、ｃｃｄＢ標的ＲＮＡ配列である。
配列番号２７４～２７７は、スペーサー配列である。
配列番号２７８は、変異型Ｃａｓ１３ｄ配列、ＮＬＳ－Ｇａ＿０５３１（ｔｒｕｎｃ）－ＮＬＳ－ＨＡである。この変異体は、非保存的Ｎ末端の欠失を有する。
配列番号２７９は、変異型Ｃａｓ１３ｄ配列、ＮＥＳ－Ｇａ＿０５３１（ｔｒｕｎｃ）－ＮＥＳ－ＨＡである。この変異体は、非保存的Ｎ末端の欠失を有する。
配列番号２８０は、全長Ｃａｓ１３ｄ配列、ＮＬＳ－ＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ－ＨＡ

である。
配列番号２８１は、変異型Ｃａｓ１３ｄ配列、ＮＬＳ－ＲｆｘＣａｓ１３ｄ（ｄｅｌ５）－ＮＬＳ－ＨＡである。この変異体は、アミノ酸５５８～５８７の欠失を有する。
配列番号２８２は、変異型Ｃａｓ１３ｄ配列、ＮＬＳ－ＲｆｘＣａｓ１３ｄ（ｄｅｌ５．１２）－ＮＬＳ－ＨＡである。この変異体は、アミノ酸５５８～５８７および９５３～９６６の欠失を有する。
配列番号２８３は、変異型Ｃａｓ１３ｄ配列、ＮＬＳ－ＲｆｘＣａｓ１３ｄ（ｄｅｌ５．１３）－ＮＬＳ－ＨＡである。この変異体は、アミノ酸３７６～３９２および５５８～５８７の欠失を有する。
配列番号２８４は、変異型Ｃａｓ１３ｄ配列、ＮＬＳ－ＲｆｘＣａｓ１３ｄ（ｄｅｌ５．１２＋５．１３）－ＮＬＳ－ＨＡである。この変異体は、アミノ酸３７６～３９２、５５８～５８７、および９５３～９６６の欠失を有する。
配列番号２８５は、変異型Ｃａｓ１３ｄ配列、ＮＬＳ－ＲｆｘＣａｓ１３ｄ（ｄｅｌ１３）－ＮＬＳ－ＨＡである。この変異体は、アミノ酸３７６～３９２の欠失を有する。
配列番号２８６は、ＡＤＡＲ２の発現を編集するために使用されるエフェクター配列である。アミノ酸１～９６９は、ｄＲｆｘＣａｓ１３であり、ａａ９７０～９９１は、ＮＬＳ配列であり、アミノ酸９９２～１３７８は、ＡＤＡＲ２$_{DD}$である。
配列番号２８７は、例示的なＨＩＶ　ＮＥＳタンパク質配列である。
配列番号２８８～２９１は、例示的なＣａｓ１３ｄモチーフ配列である。
配列番号２９２は、Ｃａｓ１３ｄオルソログ配列ＭＨ＿４８６６である。
配列番号２９３は、０３７＿－＿ｅｍｂ｜ＯＩＺＡ０１０００３１５．１｜に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２９４は、ＰＩＧ－０２２＿ＧＬ００２６３５１に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２９５は、ＰＩＧ－０４６＿ＧＬ００７７８１３に由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
配列番号２９６は、ｐｉｇ＿ｃｈｉｍｅｒａに由来する例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質配列である。
【００２５】
詳細な説明
別途注記されない限り、技術用語は、従来的な使用法に従って使用される。分子生物学における一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin, Genes VII, published by Oxford University Press, 1999; Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994;およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995;ならびに他の同様の参考文献において見出すことができる。
【００２６】
本明細書で使用される場合、単数形の「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈により別途明確に示されない限り、単数形ならびに複数形の両方を指す。本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という用語は、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」を意味する。したがって、「核酸分子を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ　ａ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」は、他の要素を排除することなく、「核酸分子を含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ　ａ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」を意味する。核酸に関するありとあらゆる塩基サイズは、およそのものであり、別途示されない限り、説明目的で提供されることを、さらに理解されたい。本明細書に記載されるものに類似であるかまたはそれと同等である多数の方法および材料を使用することができるが、特に好適な方法および材料が、以下に記載されている。矛盾が生じた場合には、用語の説明を含め、本明細書が優先される。加えて、材料、方法、および実施例は、例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。特許出願および特

許を含め、全ての参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００２７】

本開示の様々な実施形態の考察を容易にするために、特定の用語の以下の説明を、提供する。

【００２８】

Ｉ．用語

投与：対象に、薬剤、例えば、本明細書に開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質（またはＣａｓ１３ｄコード配列）またはガイド分子（またはコード配列）を、任意の有効な経路で、提供または供与することである。例示的な投与経路としては、注射（例えば、皮下、筋肉内、皮内、腹腔内、腫瘍内、および静脈内）、経皮、鼻内、および吸入の経路が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２９】

Ｃａｓ１３ｄ（ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮａｓｅについてＣａｓＲとも称される）：ＲＮＡを切り離すことができるかまたはＲＮＡに結合することができる、ＲＮＡにガイドされるＲＮＡエンドヌクレアーゼ酵素である。Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、１つまたは２つのＨＥＰＮドメインを含む（例えば、配列番号１－３、４２、６２、７０、８２、８３、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、および２９６を参照されたい）。天然のＨＥＰＮドメインは、配列ＲＸＸＸＸＨ（配列番号２５５）を含む。変異型ＨＥＰＮドメインを含み、したがって、ＲＮＡを切り離すことができないが、ガイドＲＮＡをプロセシングすることはできる、Ｃａｓ１３ｄタンパク質もまた、本開示によって包含される（例えば、配列番号２および４を参照されたい）。天然のＣａｓ１３ｄタンパク質のアライメントは、図１８Ａ～１８ＭＭＭに示される。加えて、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、特定の二次構造を有するｇＲＮＡのダイレクトリピート配列を特異的に認識する（例えば、図Ｓ２Ｃを参照されたい）。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、（１）約４～８ｎｔのループ、（２）ステムにおけるｎｔミスマッチに起因する小さな（例えば、１または２ｂｐの）バルジを含み得る、相補的なヌクレオチドから形成される４～１２ｎｔのステム、および（３）約１０～１４ｎｔ（例えば、いずれかの側に５～７）であり得る、不対ｎｔから形成されるバルジまたはオーバーハングを有するＤＲを認識し、かつ／またはそれに結合する。

【００３０】

１つの例では、全長（非短縮型）Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、８７０～１０８０の間のアミノ酸長である。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、Ｏｒｄｅｒ　Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌｅｓに由来する細菌のゲノム配列またはメタゲノム配列に由来する。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質の対応するＤＲ配列は、Ｃａｓ１３ｄ　ｇＲＮＡを含む分子においてスペーサー配列の５’末端に位置する。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄ　ｇＲＮＡにおけるＤＲ配列は、プロセシングされていないＣａｓ１３ｄガイドアレイ転写物におけるＤＲ配列と比べて、５’末端において短縮されている（例えば、少なくとも１ｎｔ、少なくとも２ｎｔ、少なくとも３ｎｔ、少なくとも４ｎｔ、少なくとも５ｎｔ、例えば、１～３ｎｔ、３～６ｎｔ、５～７ｎｔ、または５～１０ｎｔ短縮されている）。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄ　ｇＲＮＡにおけるＤＲ配列は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質によって、５’末端において５～７ｎｔ短縮されている。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、スペーサー－標的二重鎖の３’末端に隣接した標的ＲＮＡをＡ、Ｕ、Ｇ、またはＣリボヌクレオチドのいずれかによって、５’末端に隣接した標的ＲＮＡをＡ、Ｕ、Ｇ、また

はＣリボヌクレオチドのいずれかによって、切り離すことができる。

【００３１】

１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６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９１％、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％、または少なくとも９９％の配列同一性を有する。

【００３２】

１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、２つのＨＥＰＮ　Ｒｎａｓｅドメインを含有し、これらは、ＲＸＸＸＸＨアミノ酸モチーフ（配列番号２５５、ここで、Ｘは、任意のアミノ酸を示す）を含有する。加えて、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、一般的なＰｒｏｓｉｔｅ形式で記述された以下のアミノ酸モチーフのうちの１つまたは複数を含み得る。

【化１】

モチーフ1: L-x(5)-[FWY]-x(3)-K-[NQS]-[ILM]-[ILMV]-x(2)-N-x(2)-[FWY]-x(2)-[AG]-x(4)-[DE]-x-D (配列番号 195)

モチーフ2: [FWY]-[ILV]-x(2)-[NQS]-[ILV]-x(2)-[DNST]-x(2)-F-x-Y-x(2)-[HKR]-[FHY] (配列番号196)

モチーフ3: Y-[CDNSV]-x(2)-R-[FWY]-x-[ADNT]-[LM]-[ST]-x(4)-[FWY] (配列番号 197)

【００３３】

１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、一般的なＰｒｏｓｉｔｅ形式で記述された以下のアミノ酸コンセンサス配列のうちの１つまたは複数を含む。

【化２】

L-[DE]-G-K-E-I-N-x-[LM]-x-[CST]-[ANST]-L-I-x-K-F-[DE]-[GN]-I-x-[ADS]-[FIL]-x-[DEHK]-[AILV] (配列番号 288)

R-N-[FY]-I-[AIL]-x-N-V-[ILV]-x-[NS]-x(2)-F-x-Y-[ILV]-[AIV]-[KR]-[HY]-x(2)-[PT]-x(3)-[HKR]-x-[IL]-x(2)-N-x(2)-[ILV]-x(2)-[FY]-V-L-x(2)-[ILM]-[AGP]-[DE]-x(4)-[NQRS] (配列番号 289)

L-x-[LM]-[ST]-[IV]-x-Y-x(3)-K-[NS]-[ILM]-V-x-[IV]-N-[AST]-R-[FY]-x(2)-[AG]-[FY]-x-[ACV]-[LV]-E-R-D-x(2)-[FL] (配列番号 290)

P-F-[AGS]-Y-[CNV]-x-[AP]-R-[FY]-K-N-L-[ST]-x-[EN]-x-L-F-x-[DKR]-[DEN] (配列番号 291)

【００３４】

したがって、一部の例では、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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９１％、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％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号１９５、１９６、または１９７のモチーフを含む。

【００３５】

加えて、一部の例では、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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９１％、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％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号２８８、２８９、２９０、または２９１のコンセンサス配列を含む。

【００３６】

相補性：核酸が、従来的なワトソンクリック塩基対合または他の非従来的な種類のいずれかによって、別の核酸配列と水素結合を形成する能力である。相補性パーセントは、ある核酸分子における、第２の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソンクリック塩基対合）を形成することができる、残基のパーセンテージを示す（例えば、１０個中５個、６個、７個、８個、９個、１０個は、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、および１００％相補的となる）。「完全に相補的」とは、核酸配列の全ての連続した残基が、第２の核酸配列における同じ数の連続した残基と水素結合することを意味する。「実質的に相補的」とは、本明細書で使用される場合、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５

、５０、またはそれを上回るヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、または１００％である相補性の程度を指すか、またはストリンジェントな条件下においてハイブリダイズする２つの核酸を指す。

【００３７】

ＣＲＩＳＰＲ（クラスター化された規則的に間隔が空いたリピート）：ＣＲＩＳＰＲＲＮＡアレイは、ＣＲＩＳＰＲ系の明確な特徴である。「ＣＲＩＳＰＲ」という用語は、可変スペーサーが間に入った一定なダイレクトリピート（ＤＲ）を含むアレイのアーキテクチャーを指す。一部の例では、ＣＲＩＳＰＲアレイは、少なくとも、ＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサーを含む（図１Ａを参照されたい）。この特徴を、開示される計算パイプラインにおいて、新規なＣａｓ１３ｄタンパク質ファミリーを特定するために使用した（図１Ａ）。細菌において、アレイは、単一の転写物（複数のｃｒＲＮＡ単位を含有する）として転写され、これが、次いで、Ｃａｓ１３ｄタンパク質および他のＲＮａｓｅによって個々のｃｒＲＮＡへとプロセシングされる。ＣＲＩＳＰＲは、シーケンシングされている細菌ゲノムのおよそ４０％およびシーケンシングされている古細菌の９０％に見出される。ＣＲＩＳＰＲには、しばしば、ＣＲＩＳＰＲと関連するタンパク質（例えば、本明細書において提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質）をコードするｃａｓ遺伝子が付随する。開示されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、ＲＮＡ標的化に、例えば、標的ＲＮＡを検出するため、任意の所望される位置において標的ＲＮＡを修飾するため、または任意の所望される位置において標的ＲＮＡを切り離すために使用することができる。

【００３８】

下方調節またはノックダウンされる：分子、例えば、標的ＲＮＡの発現に関連して使用される場合、標的ＲＮＡの産生の減少をもたらすが、一部の例では、標的ＲＮＡ産物または標的ＲＮＡ機能の完全な排除はもたらさない、任意のプロセスを指す。１つの例では、下方調節またはノックダウンは、検出可能な標的ＲＮＡ発現または標的ＲＮＡ活性の完全な排除をもたらすものではない。一部の例では、標的ＲＮＡは、コーディングＲＮＡである。一部の例では、標的ＲＮＡは、非コーディングＲＮＡである。下方調節の標的とされ得るＲＮＡ分子の具体的な例としては、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、核ＲＮＡ、ｌｉｎｃＲＮＡ、環状ＲＮＡ、および構造ＲＮＡが挙げられる。一部の例では、標的ＲＮＡの下方調節またはノックダウンは、標的ＲＮＡの翻訳を減少させ、したがって、対応するタンパク質の存在を減少させることができる、プロセスを含む。開示されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、目的の任意の標的ＲＮＡを下方調節するために使用することができる。

【００３９】

下方調節またはノックダウンには、標的ＲＮＡの任意の検出可能な減少が含まれる。ある特定の例では、細胞または無細胞系における検出可能な標的ＲＮＡは、対照（対応する正常細胞または試料において検出される標的ＲＮＡの量など）と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％（例えば、４０％～９０％、４０％～８０％、または５０％～９５％の減少）減少する。１つの例では、対照は、正常細胞（例えば、Ｃａｓ１３ｄまたはガイドＲＮＡを含まない非組換え細胞）における相対的な発現の量である。

【００４０】

有効量：有益または所望される結果を達成するために十分である薬剤（例えば、本明細書において提供されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ剤）の量である。

【００４１】

治療有効量は、処置されている対象および疾患状態、対象の体重および年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などのうちの１つまたは複数に応じて、変動し得、これらは、当業者によって容易に決定することができる。有益な治療効果としては、診断決定の可能化、

疾患、症状、障害、もしくは病態の緩和、疾患、症状、障害、もしくは状態の発症の低減もしくは予防、および疾患、症状、障害、または病態への全般的な対抗を挙げることができる。一実施形態では、「有効量」は、疾患の症状を、例えば、（治療剤の投与がない場合と比較して）少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも５０％、少なくとも７０％、または少なくとも９０％低減するのに十分な量である。

【００４２】

この用語は、本明細書のＣａｓ１３ｄおよび／またはｇＲＮＡの発現を可能にするであろう用量、ならびに標的ＲＮＡの標的化（例えば、検出または修飾）を可能にする用量にも、適用される。

【００４３】

増加または減少：それぞれ、数の形式での、対照値からの統計学的に有意な正または負の変化である。増加は、対照値と比較して、正の変化、例えば、少なくとも５０％、少なくとも１００％、少なくとも２００％、少なくとも３００％、少なくとも４００％、または少なくとも５００％の増加である。減少は、対照値と比較して、負の変化、例えば、少なくとも２０％の減少、少なくとも２５％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも１００％の減少である。一部の例では、減少は、１００％未満の減少であり、例えば、９０％以下、９５％以下、または９９％以下の減少である。

【００４４】

単離された：「単離された」生物学的成分（例えば、Ｃａｓ１３ｄタンパク質もしくは核酸、ｇＲＮＡ、またはそれを含有する細胞）は、成分が生じた生物の細胞または組織における他の生物学的成分、例えば、他の細胞、染色体および染色体外ＤＮＡおよびＲＮＡ、ならびにタンパク質から、実質的に分離、それらとは別に産生、またはそれらから精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。この用語はまた、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸およびタンパク質を包含する。単離されたＣａｓ１３ｄタンパク質もしくは核酸、またはそれを含有する細胞は、一部の例では、少なくとも５０％純粋である、例えば、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも１００％純粋である。

【００４５】

標識：別の分子（例えば、核酸分子）に直接的または間接的にコンジュゲートされて、その分子の検出を容易にするための化合物または組成物である。標識の具体的な非限定的な例としては、蛍光部分および蛍光発生部分、色素発生部分、ハプテン、親和性タグ、ならびに放射性同位体が挙げられる。標識は、直接的に検出可能であってもよく（例えば、光学的に検出可能である）、または間接的に検出可能であってもよい（例えば、順に検出可能である１つまたは複数の追加の分子との相互作用を介して）。

【００４６】

モジュレートする：ＲＮＡの内容を変化させることである。モジュレーションとしては、ＲＮＡの活性化（例えば、上方調節）、ＲＮＡの抑制（例えば、下方調節）、リボヌクレオチドの欠失、リボヌクレオチドの挿入、リボヌクレオチドの化学修飾、リボヌクレオチドの共有結合もしくは非共有結合による連結、および／またはリボヌクレオチドの置換を挙げることができるが、これらに限定されない。

【００４７】

天然に存在しないかまたは操作された：本明細書において互換可能に使用される用語であり、人間の手の関与を示す。核酸分子またはポリペプチドに言及する場合、この用語は、核酸分子またはポリペプチドが、少なくとも実質的に、それらが自然界で天然に関連しており、かつ自然界に見出される、少なくとも１つの他の成分を含まないことを示す。加えて、この用語は、核酸分子またはポリペプチドが、自然界に見出されない配列を有することを示し得る。

【００４８】
作動可能に連結した：第１の核酸配列が、第２の核酸配列との機能的関係にある場合、第１の核酸配列は、第２の核酸配列と作動可能に連結している。例えば、プロモーターが、コード配列（例えば、Ｃａｓ１３ｄタンパク質のコード配列）の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターは、そのコード配列に作動可能に連結している。一般に、作動可能に連結したＤＮＡ配列は、連続的であり、２つのタンパク質コーディング領域を接合する必要がある場合は、同じリーディングフレーム内にある。
【００４９】
薬学的に許容される担体：本発明において有用な薬学的に許容される担体は、従来的なものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質または核酸分子（または開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質を有する開示されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用してＲＮＡを修飾するために必要とされる他の分子）の薬学的送達に好適な組成物および製剤について記載している。
【００５０】
一般に、担体の性質は、用いられる具体的な投与様式に依存することになる。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどといった、薬学的および生理学的に許容される流体を含む、注射可能な流体を含む。生物学的に中性な担体に加えて、投与しようとする医薬組成物は、少量の非毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびｐＨ緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタンを含有してもよい。
【００５１】
ポリペプチド、ペプチド、およびタンパク質：任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖であっても分枝鎖であってもよく、これは、修飾されたアミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されてもよい。この用語はまた、修飾されているアミノ酸ポリマー、例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作、例えば、標識化成分とのコンジュゲーションも包含する。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語には、天然および／または非天然もしくは合成のアミノ酸が含まれ、グリシンおよびＤまたはＬの両方の光学異性体、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣体が含まれる。
【００５２】
プロモーター：核酸の転写を指示する核酸制御配列のアレイである。プロモーターは、転写の開始部位の近傍の必要な核酸配列を含む。プロモーターは、必要に応じて、遠位のエンハンサーまたはリプレッサーエレメントも含む。「構成的プロモーター」は、継続的に活性であり、外部シグナルまたは分子による調節に供されないプロモーターである。対照的に、「誘導性プロモーター」の活性は、外部シグナルまたは分子（例えば、転写因子）によって調節される。
【００５３】
組換えまたは宿主細胞：外因性ポリヌクレオチド、例えば、組換えプラスミドまたはベクターの導入によって、遺伝子改変されているか、または遺伝子改変することができる、細胞である。典型的に、宿主細胞は、ベクターを伝播することができ、その核酸が発現される、細胞である。そのような細胞は、真核生物のものであっても原核生物のものであってもよい。この用語には、対象宿主細胞の任意の子孫も含まれる。全ての子孫は、複製の最中に生じる変異が存在し得るため、親細胞と同一ではない可能性があることを理解されたい。しかしながら、「宿主細胞」という用語が使用される場合、そのような子孫が含まれる。
【００５４】
調節エレメント：プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、および他の発現制御エレメント（例えば、転写終結シグナル、例えば、ポリアデニル化シグナルおよびポリ－Ｕ配列）を含む語句である。そのような調節エレメントは、例えば

、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されており、これは、これにより参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。調節エレメントには、多数の種類の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、およびある特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。組織特異的プロモーターは、主として、目的の所望される組織、例えば、筋肉、ニューロン、骨、皮膚、血液、特定の器官（例えば、肝臓、膵臓）、または特定の細胞型（例えば、リンパ球）において、発現を指示することができる。調節エレメントはまた、時間依存性様式で、例えば、細胞周期依存性または発生段階依存性の様式で、発現を指示することもでき、これは、さらに組織または細胞型特異的であってもそうでなくてもよい。

【００５５】

一部の実施形態では、本明細書において提供されるベクターには、ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター（例えば、Ｕ６およびＨ１プロモーター）、ｐｏｌ　ＩＩプロモーター（例えば、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター（必要に応じて、ＲＳＶエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（必要に応じて、ＣＭＶエンハンサーを伴う）、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、β－アクチンプロモーター、ホスホグリセリン酸（phosphoglycerol）キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、およびＥＦ１αプロモーター）、または両方が含まれる。

【００５６】

エンハンサーエレメント、例えば、ＷＰＲＥ、ＣＭＶエンハンサー、ＨＴＬＶ－ＩのＬＴＲにおけるＲ－Ｕ５’セグメント、ＳＶ４０エンハンサー、ならびにウサギβ－グロビンのエクソン２および３の間のイントロン配列もまた、「調節エレメント」という用語に包含される。

【００５７】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄコード配列は、プロモーター、エンハンサーエレメント、または両方に作動可能に連結している。

【００５８】

ＲＮＡ編集：操作されたヌクレアーゼ（例えば、本明細書において提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質）を使用して、生物のゲノムにおいてＲＮＡ分子（またはＲＮＡのリボヌクレオチド）を挿入するか、欠失させるか、または置き換え、それにより、ＲＮＡの所望される位置に部位特異的な鎖の破断を生じる、遺伝子操作の一種である。誘導された破断部は、修復され、標的化された変異または修復をもたらす。本明細書に開示されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ方法、例えば、Ｃａｓ１３ｄを使用するものは、１つまたは複数の標的ＲＮＡ、例えば、がん（例えば、乳がん、結腸がん、肺がん、前立腺がん、黒色腫）、感染性疾患（例えば、ＨＩＶ、肝炎、ＨＰＶ、および西ナイルウイルス）、または神経変性障害（例えば、ハンチントン病またはＡＬＳ）と関連するものの配列を編集するために使用することができる。例えば、ＲＮＡ編集は、疾患またはウイルス感染を処置するために使用することができる。

【００５９】

ＲＮＡ挿入部位：外因性ポリヌクレオチドの挿入の標的とされるかまたは挿入を受けた、ＲＮＡの部位である。開示される方法は、開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質の使用を含み、これは、ＲＮＡを、ＲＮＡ挿入部位における操作の標的とするために使用することができる。

【００６０】

配列同一性／類似性：アミノ酸（またはヌクレオチド）配列間の類似性は、配列間の類似性に関して表され、それ以外には配列同一性と称される。配列同一性は、同一性（または類似性もしくは相同性）のパーセンテージに関して測定されることが多く、パーセンテージが高いほど、２つの配列は類似している。

【００６１】

比較のための配列のアライメント方法は、当該技術分野において周知である。様々なプ

ログラムおよびアライメントアルゴリズムが、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73:237, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881, 1988;およびPearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988において記載されている。Altschul et al., Nature Genet. 6:119, 1994は、配列アライメント方法および相同性の計算についての詳細な考察を提示している。

【００６２】

ＮＣＢＩのＢａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）（Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990）が、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）を含む様々な供給源から、およびインターネット上で、配列分析プログラムｂｌａｓｔｐ、ｂｌａｓｔｎ、ｂｌａｓｔｘ、ｔｂｌａｓｔｎ、およびｔｂｌａｓｔｘと併せて使用するために、入手可能である。このプログラムを使用して配列同一性を判定する方法に関する説明は、インターネット上でＮＣＢＩのウェブサイトにおいて入手可能である。

【００６３】

当該技術分野において公知であり本明細書に開示されるタンパク質および核酸配列のバリアントは、典型的に、ＮＣＢＩ Ｂｌａｓｔ ２．０を、ギャップ付きｂｌａｓｔｐをデフォルトのパラメーターに設定して使用して、アミノ酸配列との全長アライメントにわたって計数される少なくとも約８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有することによって特徴付けられる。約３０アミノ酸を上回るアミノ酸配列の比較については、Ｂｌａｓｔ ２配列関数を、デフォルトのＢＬＯＳＵＭ６２マトリックスをデフォルトのパラメーター（ギャップ存在コスト１１および残基ごとのギャップコスト１）に設定して使用して、用いる。短いペプチド（およそ３０アミノ酸よりも少ない）をアライメントする場合、アライメントは、Ｂｌａｓｔ ２配列関数を使用し、ＰＡＭ３０マトリックスをデフォルトのパラメーター（ギャップオープンペナルティ９、ギャップ伸長ペナルティ１）に設定して用いて、実行するものとする。参照配列に対してさらに高い類似性を有するタンパク質は、この方法によって評価した場合、同一性パーセンテージの増加、例えば、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を示すであろう。全長に満たない配列を、配列同一性に関して比較する場合、ホモログおよびバリアントは、典型的に、１０～２０アミノ酸の短い枠にわたって少なくとも８０％の配列同一性を有し、参照配列に対する類似性に応じて、少なくとも８５％または少なくとも９０％または少なくとも９５％の配列同一性を有し得る。そのような短い枠にわたる配列同一性を判定するための方法は、インターネット上でＮＣＢＩのウェブサイトにおいて入手可能である。当業者であれば、これらの配列同一性の範囲が、案内のためだけに提供されており、提供された範囲に含まれない強力に有意なホモログが入手され得ることもまったく可能であることを、理解するであろう。

【００６４】

したがって、１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１

１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６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９１％、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％、または少なくとも９９％の配列同一性を有する。

【００６５】

対象：脊椎動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトである。哺乳動物には、ネズミ科動物、類人猿、ヒト、家畜、競技動物、および愛玩動物が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、対象は、非ヒト哺乳動物対象、例えば、サルまたは他の非ヒト霊長類、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシである。一部の例では、対象は、本明細書において提供される方法を使用して処置することができる障害（例えば、ウイルス感染）または遺伝子疾患を有する。一部の例では、対象は、本明細書において提供される方法を使用して診断することができる障害（例えば、ウイルス感染）または遺伝子疾患を有する。一部の例では、対象は、研究室動物／生物、例えば、ゼブラフィッシュ、Ｘｅｎｏｐｕｓ、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ、マウス、ウサギ、またはラットである。ｉｎ ｖｉｖｏで得られたかまたはｉｎ ｖｉｔｒｏで培養された生物学的実体の組織、細胞、およびそれらの子孫もまた、包含される。

【００６６】

治療剤：対象に投与したときに、何らかの有益な効果を付与する１つまたは複数の分子または化合物を指す。有益な治療効果としては、診断決定の可能化、疾患、症状、障害、もしくは病態の緩和、疾患、症状、障害、もしくは状態の発症の低減もしくは予防、ならびに疾患、症状、障害、または病態への全般的な対抗を挙げることができる。

【００６７】

形質導入された、形質転換された、およびトランスフェクトされた：ウイルスまたはベクターは、核酸分子を細胞に移入する場合、細胞に「形質導入する」。細胞ゲノムへの核酸の組込みまたはエピソーム複製のいずれかによって、核酸が細胞によって安定に複製されるようになる場合、細胞は、細胞に形質導入された核酸によって「形質転換されている」かまたは「トランスフェクトされている」。

【００６８】

これらの用語は、ウイルスベクターのトランスフェクション、プラスミドベクターを用いた形質転換、ならびにエレクトロポレーション、リポフェクション、粒子銃加速、および当該技術分野において公知の他の方法によるネイキッドＤＮＡの導入を含め、核酸分子をそのような細胞に導入することができる全ての技法を包含する。一部の例では、方法は、化学的方法（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション）、物理的方法（例えば、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、微粒子銃）、融合（例えば、リポソーム）、受容体に媒介されるエンドサイトーシス（例えば、ＤＮＡ－タンパク質複合体、ウイルスエンベロープ／キャプシド－ＤＮＡ複合体）、ならびにウイルス、例えば、組換えウイルスによる生物学的感染（Wolff, J. A., ed, Gene Therapeutics, Birkhauser, Boston, USA, 1994）である。核酸分子を細胞に導入するための方法は、公知である（例えば、米国特許第６，１１０，７４３号を参照されたい）。これらの方法を使用して、細胞に、そのゲノムを操作するための開示される薬剤を形質導入することができる。

【００６９】

導入遺伝子：外因性遺伝子である。

【００７０】

処置すること、処置、および治療法：あらゆる客観的または主観的パラメーター、例えば、症状の減退、寛解、減少、または状態を患者にとってより寛容されるものにすること、変性または低下の速度の遅延、変性の最終点を衰弱性の低いものにすること、患者の身体的または精神的健康状態を改善すること、または生存期間の長さを延長することを含め、外傷、病理、または状態の軽減または緩和におけるあらゆる成功またはその成功の兆候である。処置は、身体検査、血液検査、および他の臨床検査の結果などを含む、客観的または主観的パラメーターによって評価することができる。予防上の利益のために、開示される組成物は、特定の疾患、状態、または症状を発症する危険性にある対象に、または疾患の生理学的症状のうちの１つまたは複数を報告している対象に、疾患、状態、または症状が、まだ現れていない可能性がある場合であったとしても、投与することができる。

【００７１】

上方調節される：分子、例えば、標的ＲＮＡの発現に関連して使用される場合、標的ＲＮＡの産生の増加をもたらす任意のプロセスを指す。１つの例では、例えば、標的ＲＮＡが、それ自体の転写を伴うフィードバックループに関与する場合、直接的な上方調節を含む。１つの例では、間接的な上方調節、例えば、ｍｉＲＮＡの標的の活性化をもたらす、阻害性ｍｉＲＮＡのノックダウンによるものを含む。

【００７２】

一部の例では、標的ＲＮＡは、コーディングＲＮＡである。一部の例では、標的ＲＮＡは、非コーディングＲＮＡである。上方調節の標的とされ得るＲＮＡ分子の具体的な例としては、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、核ＲＮＡ、および構造ＲＮＡが挙げられる。一部の例では、標的ＲＮＡの上方調節または活性化は、標的ＲＮＡの翻訳を増加させ、したがって、対応するタンパク質の存在を増加させることができる、プロセスを含む。開示されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、目的の任意の標的ＲＮＡを上方調節するために使用することができる。

【００７３】

上方調節には、標的ＲＮＡの任意の検出可能な増加が含まれる。ある特定の例では、細胞または無細胞系（例えば、本明細書に開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質およびｇＲＮＡを発現する細胞）における検出可能な標的ＲＮＡの発現は、対照（例えば、対応する正常細胞または試料において検出される標的ＲＮＡの量）と比較して、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも１００％、少なくとも２００％、少なくとも４００％、または少なくとも５００％増加する。１つの例では、対照は、正常細胞（例えば、Ｃａｓ１３ｄまたはガイドＲＮＡを含まない非組換え細胞）における相対的な発現の量である。

【００７４】

十分な条件下：所望される活性を可能にする任意の環境を説明して使用される語句である。１つの例では、所望される活性は、例えば、標的ＲＮＡをモジュレートするための、他の必要なエレメントと組み合わせた、本明細書に開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質の発現である。

【００７５】

ベクター：宿主細胞におけるベクターの複製および／または組込みの能力を破壊することなく、外来核酸分子を導入することができる、核酸分子である。ベクターには、一本鎖、二本鎖、または部分的に二本鎖である核酸分子、１つまたは複数の遊離末端を含む、遊離末端を含まない（例えば、環状の）核酸分子、ＤＮＡ、ＲＮＡ、または両方を含む核酸分子、ならびに当該技術分野において公知の他の様々なポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【００７６】

ベクターは、宿主細胞においてそれが複製するのを可能にする核酸配列、例えば、複製起点を含み得る。ベクターはまた、１つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および当該技術分野において公知の他の遺伝子エレメントも含み得る。組込みベクターは、それ自

体を宿主核酸に組み込むことができる。発現ベクターは、挿入された遺伝子の転写および翻訳を可能にするために必要な調節配列を含有するベクターである。

【００７７】

ベクターの１つの種類には、「プラスミド」があり、これは、追加のＤＮＡセグメントを、例えば、標準的な分子クローニング技法によって挿入することができる、環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別の種類のベクターには、ウイルスベクターがあり、これは、ウイルス由来のＤＮＡまたはＲＮＡ配列が、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）へのパッケージングのためにベクターに存在している。ウイルスベクターには、宿主細胞へのトランスフェクションのためにウイルスによって担持されるポリヌクレオチドが含まれる。一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルス（例えば、組込み欠損レンチウイルスベクター）またはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである。

【００７８】

ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって、宿主ゲノムと共に複製される。

【００７９】

ある特定のベクターは、それらが動作可能に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と称される。一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。組換え発現ベクターは、本明細書において提供される核酸（例えば、ガイドＲＮＡ［ＲＮＡ配列またはＲＮＡ配列から発現され得る］、Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸）を、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態で含み得るが、これは、組換え発現ベクターが、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択され得る、発現させようとする核酸配列に動作可能に連結された１つまたは複数の調節エレメントを含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結した」とは、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節エレメントに連結されていることを意図する（例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合は宿主細胞において）。当業者であれば、発現ベクターの設計が、形質転換しようとする宿主細胞の選択、所望される発現のレベルなどの要因に依存し得ることを理解するであろう。ベクターを、宿主細胞に導入し、それによって、本明細書に記載される核酸によってコードされる、融合タンパク質またはペプチドを含めた転写物、タンパク質、またはペプチド（例えば、クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文構造のリピート（ＣＲＩＳＰＲ）転写物、タンパク質、酵素、その変異体形態、その融合タンパク質など）を産生することができる。

【００８０】

ＩＩ．いくつかの実施形態の概要

クラス２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、微生物に、多様な獲得免疫機序を与えている。ＶＩ－Ｄ型として分類される、ＲＮＡにガイドされるＲＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲ系の特徴付けがなされていないファミリーを特定するための、原核生物ゲノムおよびメタゲノム配列の分析が、本明細書において提供される。７つの異なるオルソログの生物化学的特徴付けおよびタンパク質操作により、ヒト細胞においてロバストな活性を有するＲｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＸＰＤ３００２に由来するリボヌクレアーゼエフェクター（ＣａｓＲｘ）が得られた。ＣａｓＲｘに媒介されるノックダウンは、多様な内因性転写物にわたり、ＲＮＡ干渉と比べて高い効率性および特異性を呈する。最もコンパクトな単一エフェクターＣａｓ酵素の１つとして、ＣａｓＲｘはまた、アデノ随伴ウイルスに柔軟にパッケージングすることができる。ウイルスによりコードされる触媒不活性ＣａｓＲｘは、選択的スプライシングを操作するためのプレｍＲＮＡのシスエレメントを標的にすることができ、前頭側頭型認知症の神経細胞モデルにおいて、調節不全となっ

たタウ異性体比を改善する。本明細書における結果は、ＣａｓＲｘを、細胞内ＲＮＡの効率的な標的化のためのプログラム可能なＲＮＡ結合モジュールとして提示し、トランスクリプトーム操作および治療方法のための一般的なプラットフォームを実現する。

【００８１】

クラス２のＣＲＩＳＰＲ系は、多様な細菌および古細菌の生命全体で見出される。原核生物ゲノムおよびメタゲノム配列のバイオインフォマティック発掘に、ＣＲＩＳＰＲリピートアレイおよび近傍のタンパク質のみを必要とするＣＲＩＳＰＲ遺伝子座の最小の定義を使用し、ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ｄと表記される、特徴付けがなされていない著しくコンパクトなＲＮＡを標的にするクラス２のＣＲＩＳＰＲ系のファミリーの特定が、本明細書において提供される。

【００８２】

ＣＲＩＳＰＲ系は、概して、ゲノム配列の２０キロ塩基以内に機能性オペロンとして存在するため、断片化されたメタゲノムリードでさえ、生体操作目的に有用なＣａｓ酵素を回収するのに十分であり得る。本明細書およびその他（Shmakov et al., 2015）によって記載されるＣＲＩＳＰＲゲノム発掘戦略は、次世代シーケンシングにより微生物集団をプロファイリングするための現在行われている試みとの組合せで、ゲノム操作ツールボックスへの機械的に多様な付加に寄与するはずである。

【００８３】

ＣＲＩＳＰＲリピートアレイを、ＨＥＰＮドメインに依存しない機序により、成熟したガイドへとプロセシングし、続いて、相補的な活性化ＲＮＡのガイド配列依存性認識を行う、Ｃａｓ１３ｄエフェクターの２つの異なるリボヌクレアーゼ特性を、生物化学的に特徴付けた。これは、ＨＥＰＮに媒介されるＲＮａｓｅ活性をトリガーし、Ｃａｓ１３ｄが、活性化ＲＮＡおよびバイスタンダーＲＮＡの両方を切断することを可能にするが、この特性は、他のＲＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲ系に共通している。Ｃａｓ１３ｄは、さらに、明らかな隣接配列の要件を示さず、標的ＲＮＡをタイリングするｃｒＲＮＡにわたって活性であることが見出され、任意の一本鎖ＲＮＡ配列を標的にする能力が示唆された。

【００８４】

Ｃａｓ１３ｄファミリーの異なる分枝から試料採取したＣａｓ１３ｄオルソログの、ヒト細胞における包括的な活性レポータースクリーニングにより、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２に由来するＣａｓ１３ｄ（ＣａｓＲｘ）へのＮＬＳ融合体を、真核生物の状況において、プログラム可能なＲＮＡ標的化のために操作することができることが明らかとなった（図８Ｄ）。ＣａｓＲｘ融合体は、１４の内因性ｍＲＮＡおよびｌｎｃＲＮＡの多様なセットをノックダウンし、ＲＮＡ干渉、ｄＣａｓ９に媒介されるＣＲＩＳＰＲ干渉、およびＣａｓ１３スーパーファミリーの他のメンバーと比べて、９０％を上回るノックダウンを、望ましい効率で、一貫して達成した（図１０Ａ～１０Ｃ）。加えて、ＣａｓＲｘ干渉は、スペーサーが一致するｓｈＲＮＡよりも顕著に特異性が高く、ＲＮＡ干渉での数百と比較して、検出可能なオフターゲットの変化はない。

【００８５】

ＣａｓＲｘは、操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ｄエフェクターおよび関連するガイドＲＮＡを含む最小の２つの構成要素のプラットフォームであり、完全に遺伝的にコードすることができる。ＣａｓＲｘは、直交的に送達されるタンパク質であるため、ＨＥＰＮ不活性ｄＣａｓＲｘは、特定のＲＮＡエレメントを標的にするように、可動性ＲＮＡ結合モジュールとして操作することができる。重要なことに、ＣａｓＲｘは、ガイドＲＮＡをプロセシングするために異なるリボヌクレアーゼ活性を使用するため、ｄＣａｓＲｘは、依然として、多重の適用のためにリピートアレイと対合させることができる。この概念の有用性は、選択的スプライシングおよび結果として得られるタンパク質異性体比を調整するためのｄＣａｓＲｘスプライスエフェクター融合体を作製し、前頭側頭型認知症の神経細胞モデルにそれを適用することによって、本明細書において示される。

【００８６】

平均サイズが９３０ａａで、Ｃａｓ１３ｄは、哺乳動物細胞において特徴付けられている最も小さなクラス２のＣＲＩＳＰＲエフェクターである。このことにより、ＣａｓＲｘエフェクタードメイン融合体を、複数のガイドＲＮＡをコードするＣＲＩＳＰＲアレイと対合させ、同時に、初代細胞およびｉｎ　ｖｉｖｏ送達のために多用途のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）送達ビヒクル（Naldini, 2015）のパッケージングサイズ限度下に留めることが可能となっている。さらに、特定の有糸分裂後細胞型、例えば、ニューロンへのＣａｓＲｘの標的化ＡＡＶ送達は、調整的ペイロードの長期発現を媒介して恒久的な遺伝子修飾および頻繁な再投与を回避し（Chiriboga et al., 2016）、他の核酸標的化技術、例えば、ＤＮＡヌクレアーゼ編集またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを補うことができる。ＲＮＡのミススプライシングによる疾患は、最大で遺伝子疾患の１５％を占めると推測されており（Hammond and Wood, 2011）、多重標的化を可能にする操作されたスプライスエフェクターの可能性が強調される。本明細書において提供される材料は、ノックダウンおよびスプライシングのＲＮＡ標的化、例えば、生細胞標識および遺伝子スクリーニングから、転写物のイメージング、輸送、または調節に、使用することができる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ｄおよび操作されたバリアント、例えば、ＣａｓＲｘは、集合的に、柔軟な核酸操作、トランスクリプトーム関連の研究、および治療を可能にし、ＤＮＡを越えてＲＮＡへとゲノム編集ツールボックスを拡張する。

【００８７】

１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標的にする（例えば、修飾、検出する）方法、例えば、クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文構造のリピート（ＣＲＩＳＰＲ）－ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）系に媒介されるＲＮＡ編集方法が、本明細書において提供される。そのような方法は、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、天然に存在しないかまたは操作された（例えば、それが導入される細胞または系に天然に存在しない）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と接触させるステップを含み得る。したがって、一部の例では、開示されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、天然に存在するＣａｓ１３ｄタンパク質（またはコード配列）および天然に存在するｇＲＮＡを含むが、そのＣａｓ１タンパク質（またはコード配列）およびｇＲＮＡが天然に見出されない系または細胞において使用される。さらに、ｇＲＮＡ分子内のスペーサー配列は、天然に存在せず、標的ＲＮＡ分子に相補的となるように修飾されている。

【００８８】

一部の例では、標的ＲＮＡは、コーディングＲＮＡである。一部の例では、ＲＮＡは、非コーディングＲＮＡである。

【００８９】

開示されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系には、（１）少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質または少なくとも１つのＣａｓ１３ｄ核酸コード配列（例えば、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質をコードするｍＲＮＡまたはベクター）、および（２）標的ＲＮＡ分子とハイブリダイズすることができるように、標的ＲＮＡに対して十分な相補性を有する少なくとも１つのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ガイド核酸分子（例えば、ｇＲＮＡ）（またはｇＲＮＡをコードする少なくとも１つの核酸分子）が含まれ得る。Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成し、ｇＲＮＡが、この複合体を、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子へと指向させる。この標的化により、Ｃａｓ１３ｄ－ｇＲＮＡ複合体が、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を修飾または検出することが可能となり得る。一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子（または１つもしくは複数の標的ＲＮＡ分子を含有する細胞）を、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質および少なくとも１つのｇＲＮＡを含む複合体と接触させる。一部の例では、系は、Mg^{2+}を含む。しかしながら、標的ＲＮＡの切断が所望されない場合など、一部の例では、系は、Mg^{2+}を必要としない。

【００９０】

一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と接触させるステップは、例えば、エンドサイトーシス（例えば、受容体に媒介されるエンドサイトーシス、マイクロピノサイトーシス）、リポソー

ム、粒子、エクソソーム、微細小胞、遺伝子銃、エレクトロポレーション、ウイルス、ＲＮＰ－抗体融合体（例えば、Ｃａｓ１３ｄ　ＲＮＰを、抗体、抗体断片、または他の標的化部分［例えば、ＳｃＦｖ、アプタマー、ＤＡＲＰｉｎ、ナノボディ、アフィボディなど］にテザリングすることによって、ＲＮＰは、細胞内にエンドサイトーシスされるが、ＲＮＰは、それ以外の多数のものにテザリングすることができることが想定される）、またはこれらの組合せを使用して、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を含有する細胞（例えば、真核生物細胞または原核生物細胞）に、天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を導入するステップを含む。したがって、細胞は、開示されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の適切な核酸分子が形質転換され得るか、形質導入され得るか、トランスフェクトされ得るか、またはそれ以外では接触され得る。結果として得られる細胞は、組換え細胞である。一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を、天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と接触させるステップは、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を含有する無細胞系（例えば、生物学的試料もしくは環境試料、または細胞ライセート）を、天然に存在しないかまたは操作されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系と（例えば、標的ＲＮＡを検出するための診断方法において）接触させることを含む。

【００９１】

一部の例では、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも１０、または少なくとも２０の異なるｇＲＮＡが、使用される。例えば、そのような方法には、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも１０、または少なくとも２０の異なる標的ＲＮＡ分子を標的にすること、１つまたは複数のＲＮＡ分子の少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも１０、または少なくとも２０の異なる領域を標的にすること、またはこれらの組合せが含まれ得る。

【００９２】

そのようなＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする単離された核酸分子、例えば、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ、またはｍＤＮＡもまた、提供される。そのような単離された核酸分子は、ベクター（例えば、プラスミドまたはウイルスベクター）の一部であってもよく、プロモーターに作動可能に連結していてもよい。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１３９、１４０、または１４１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％の配列同一性を有するか、または配列番号１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１４２、１４３、１４４、または１４５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％の配列同一性を有する。追加の例では、単離された核酸は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４

９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６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％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする。

【００９３】

一部の例では、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする単離された核酸分子（これは、ベクターの一部であってもよい）は、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列を含む。１つの例では、そのようなＣａｓ１３ｄコード配列は、配列番号１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１４２、１４３、１４４、または１４５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％の配列同一性を有するか、または配列番号１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１３９、１４０、または１４１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％の配列同一性を有する。追加の例では、真核生物細胞コドン最適化核酸配列は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６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％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする。

【００９４】

一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子とハイブリダイズするｇＲＮＡは、１つまたは複数のダイレクトリピート（ＤＲ）配列、１つまたは複数のスペーサー配列、またはＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサーを含む１つまたは複数の配列を含む。一部の例では、１つまたは複数のＤＲ配列は、配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５４、１５６、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９１、１９２、１９３、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５、２１７、２１９、２２１、２２３、２２５、２２７、２２８、２３０、２３２、２３４、２３６、２３８、２４０、２４２、２４４、２４６、２４８、２５０、２５２、または２５４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１

００％の配列同一性を有する。１つの例では、ｇＲＮＡは、追加の配列、例えば、アプタマー配列を含む。

【００９５】

一部の例では、複数のｇＲＮＡが、単一のアレイ転写物からプロセシングされ、それぞれのｇＲＮＡは、例えば、異なるＲＮＡを標的にするか、または単一のＲＮＡの複数の領域を標的にするために、異なってもよい。

【００９６】

一部の例では、ＤＲは、例えば、成熟した事前プロセシングガイドＲＮＡとして発現させるために、５’末端において、１～１０ヌクレオチド（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチド）短縮されている。

【００９７】

１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を標的にする方法が、提供される。ＲＮＡ分子を標的にするステップは、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を切り離すかまたはそれにニックを入れるステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を活性化または上方調節するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子の翻訳を活性化または抑制するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を脱活性化するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を視覚化、標識、または検出するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を結合するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を編集するステップ、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を輸送するステップ、および１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子をマスクするステップのうちの１つまたは複数を含み得る。一部の例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子を修飾するステップは、ＲＮＡ塩基置換、ＲＮＡ塩基欠失、ＲＮＡ塩基挿入、標的ＲＮＡにおける破断、ＲＮＡのメチル化、およびＲＮＡの脱メチル化のうちの１つまたは複数を含む。

【００９８】

一部の例では、そのような方法は、疾患、例えば、ヒトにおける疾患を処置するために使用される。そのような例では、１つまたは複数の標的ＲＮＡ分子は、疾患と関連している。

【００９９】

天然に存在しないタンパク質を含む、単離されたタンパク質もまた、提供される。一部の例では、タンパク質は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６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％の配列同一性を有する。一部の例では、単離されたタンパク質は、原核生物ゲノムまたはメタゲノム、消化管メタゲノム、活性汚泥メタゲノム、嫌気性消化器メタゲノム、ニワトリ消化管メタゲノム、ヒト消化管メタゲノム、ブタ消化管メタゲノム、ウシ消化管メタゲノム、ヒツジ消化管メタゲノム、ヤギ消

化管メタゲノム、カピバラ消化管メタゲノム、霊長類消化管メタゲノム、シロアリ消化管メタゲノム、糞便メタゲノム、Ｏｒｄｅｒ　ＣｌｏｓｔｒｉｄｉａｌｅｓまたはＦａｍｉｌｙ　Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃａｃｅａｅ由来のゲノムに由来するＣａｓ１３ｄオルソログである。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄオルソログは、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ａｌｂｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＦＤ－１、無培養Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ　ＴＳ２８－ｃ４０９５、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｂｉｃｉｒｃｕｌａｎｓ、またはＲｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ　ＣＡＧ５７に由来するＣａｓ１３ｄオルソログを含む。そのようなタンパク質は、細胞内局在化シグナルを含み得る。一部の例では、そのようなタンパク質は、少なくとも１つの天然のＨＥＰＮドメインにおける変異を含む。

【０１００】

単離されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）分子もまた、提供される。一部の例では、単離されたｇＲＮＡは、１つまたは複数のダイレクトリピート（ＤＲ）配列、例えば、配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５４、１５６、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９１、１９２、１９３、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５、２１７、２１９、２２１、２２３、２２５、２２７、２２８、２３０、２３２、２３４、２３６、２３８、２４０、２４２、２４４、２４６、２４８、２５０、２５２、または２５４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％の配列同一性を有するものを含む。そのようなｇＲＮＡは、標的ＲＮＡに特異的な（例えば、それに相補的な）１つまたは複数のスペーサー配列をさらに含み得る。そのようなガイドＲＮＡは、さらに、必要に応じて、例えば、事前プロセシングガイドＲＮＡを生成するために、ＤＲの５’末端において、１～１０ヌクレオチド（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチド）短縮されていてもよい。

【０１０１】

本明細書において提供される１つまたは複数のＣａｓ１３ｄタンパク質および本明細書において提供される１つまたは複数のｇＲＮＡを含む、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体もまた、提供される。

【０１０２】

本明細書において提供される任意のＣａｓ１３ｄタンパク質（またはＣａｓ１３ｄをコードする核酸分子）、任意のｇＲＮＡ、任意のＲＮＰ複合体、または任意のベクターを含む、組換え細胞もまた、提供される。１つの例では、細胞は、細菌細胞ではない。１つの例では、細胞は、細菌細胞である。

【０１０３】

本明細書において提供される任意のＣａｓ１３ｄタンパク質（またはＣａｓ１３ｄをコードする核酸分子）、任意のｇＲＮＡもしくはアレイ、任意のＲＮＰ複合体、任意の単離された核酸分子、任意のベクター、または任意の細胞のうちの１つまたは複数を含む、組成物もまた、提供される。そのような組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。

【０１０４】

キットもまた、提供される。そのようなキットは、本明細書において提供される任意のＣａｓ１３ｄタンパク質（またはＣａｓ１３ｄをコードする核酸分子）、任意のｇＲＮＡもしくはアレイ、任意のＲＮＰ複合体、任意の単離された核酸分子、任意のベクター、任意の細胞、または任意の組成物のうちの１つまたは複数を含み得る。そのような試薬は、組み合わされていてもよく、または別個の容器に入っていてもよい。

【０１０５】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、タンパク質（またはタンパク質コードする核酸）を、全長もしくは部分的なダイレクトリピート配列に続いてＲＮＡ標的に相補的な「スペーサー」配列からなる操作されたＲＮＡガイド（またはＲＮＡガイドをコードする核酸）（またはその変化形、すなわち、アレイ（ＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサーなど）またはｐｒｅガイドＲＮＡ（ＤＲ－スペーサー－ＤＲ）と組み合わせることによって、そのＲＮＡ標的に対してプログラムされる。Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、触媒的に不活性化させ、保存されたＲＮＡｓｅ　ＨＥＰＮモチーフ（ＲＸＸＸＸＨ）を変異させることによって、ＲＮＡ結合モジュールに形質転換させることができる。例示的なＣａｓ１３ｄタンパク質および対応するガイドが、本明細書において提供される（例えば、配列番号１４７～１７０、１７５～１９３、および配列番号１９８～２５４）。

【０１０６】

Ａ．Ｃａｓ１３ｄタンパク質

新規なＣａｓ１３ｄタンパク質、例えば、配列表に示されているものが、本明細書において提供される。配列番号１、３、４２、６２、７０、８２、８３、９２、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２９２、２９３、２９４、２９５および２９６は、異なる全長タンパク質を提供し、配列番号２、４～４１、４３～６１、６３～６９、７１～８１、８４～９１、９３～１１３、１９４、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、および２８５は、Ｃａｓ１３ｄバリアントおよび断片を提供する。そのようなタンパク質は、開示される方法、組成物、およびキットにおいて使用することができる。

【０１０７】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、１つまたは複数（例えば、１つまたは２つ）の天然のＨＥＰＮドメインを含む。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、１つまたは複数の変異型ＨＥＰＮドメインを含む（例えば、変異体Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、ｇＲＮＡをプロセシングすることができるが、標的ＲＮＡを修飾することはできない）。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、１５０ｋＤ以下、１４０ｋＤ以下、１３０ｋＤ以下、１２０ｋＤ以下、例えば、約９０～１２０ｋＤ、約１００～１２０ｋＤ、または約１１０ｋＤである。

【０１０８】

本明細書において提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質に加えて、本開示は、原核生物ゲノムまたはメタゲノム、消化管メタゲノム、活性汚泥メタゲノム、嫌気性消化器メタゲノム、ニワトリ消化管メタゲノム、ヒト消化管メタゲノム、ブタ消化管メタゲノム、ウシ消化管メタゲノム、ヒツジ消化管メタゲノム、ヤギ消化管メタゲノム、カピバラ消化管メタゲノム、霊長類消化管メタゲノム、シロアリ消化管メタゲノム、糞便メタゲノム、Ｏｒｄｅｒ　ＣｌｏｓｔｒｉｄｉａｌｅｓまたはＦａｍｉｌｙ　Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃａｃｅａｅ由来のゲノムに由来するＣａｓ１３ｄオルソログ、例えば、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ａｌｂｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ　ＦＤ－１、無培養Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ　ＴＳ２８－ｃ４０９５、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｂｉｃｉｒｃｕｌａｎｓ、またはＲｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ　ＣＡＧ５７に由来するＣａｓ１３ｄオルソログを包含する。

【０１０９】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、少なくとも８００ａａ、少なくとも９００ａａ、または少なくとも１０００ａａ、例えば、８００～１２００ａａ、８５０～１０５０ａａ、または８６０～１０４０ａａである。

【０１１０】
１．バリアントＣａｓ１３ｄ配列
本明細書において提供される配列のバリアント（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６のバリアント）を含む、Ｃａｓ１３ｄタンパク質が、本開示に包含される。一部の例では、本明細書において提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質は、１つまたは複数の変異、例えば、単一の挿入、単一の欠失、単一の置換、またはこれらの組合せを含有し得る。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、少なくとも１、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも７５、少なくとも１００、少なくとも２００、または少なくとも３００のａａ挿入、例えば、１～２０の挿入（例えば、Ｎ末端もしくはＣ末端におけるまたはタンパク質内における、例えば、小さなドメイン全体の挿入）、少なくとも１、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも７５、少なくとも１００、少なくとも２００、または少なくとも３００のａａ欠失（例えば、小さなドメイン全体の欠失）、例えば、１～２０の欠失（例えば、Ｎ末端もしくはＣ末端におけるまたはタンパク質内における）、少なくとも１、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０のａａ置換、例えば、１～２０の置換、またはこれらの任意の組合せ（例えば、単一の挿入と、１～１９の置換）を含むが、ｇＲＮＡ分子内のスペーサー配列に相補的な標的ＲＮＡ分子に結合するおよび／もしくまたはガイドアレイＲＮＡ転写物をｇＲＮＡ分子にプロセシングする能力を保持する、かつ／または標的ＲＮＡを切断する能力を保持する。非保存的領域に欠失を有する例示的なＣａｓ１３タンパク質は、配列番号２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、および２８５に示されている。一部の例では、本開示は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０個のアミノ酸変化を有するが、ｇＲＮＡ分子内のスペーサー配列に相補的な標的ＲＮＡ分子に結合するおよび／またはガイドアレイＲＮＡ転写物をｇＲＮＡ分子にプロセシングする能力を保持する、任意の開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１

０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６）のバリアントを提供する。一部の例では、任意の開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１もしくは２５、またはそれらのバリアント、例えば、配列番号２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６は、１～８つのアミノ酸挿入、１～１５のアミノ酸欠失、１～１０のアミノ酸置換、またはこれらの任意の組合せ（例えば、１～１５、１～４、または１～５つのアミノ酸欠失と、１～１０、１～５、または１～７つのアミノ酸置換）をさらに含み、ｇＲＮＡ分子内のスペーサー配列に相補的な標的ＲＮＡ分子に結合するおよび／またはガイドアレイＲＮＡ転写物をｇＲＮＡ分子にプロセシングする能力が、保持されている。１つの例では、そのようなバリアントペプチドは、標準的な手順、例えば、部位指向的変異生成またはＰＣＲを使用して、ペプチドをコードするヌクレオチド配列を操作することによって、産生される。そのようなバリアントはまた、化学的に合成することができる。

【０１１１】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号１９５、１９６、または１９７に示されるモチーフを含む。したがって、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄタンパク質は、一部の例では、配列番号１９５、１９６、または１９７に示される少なくとも１つのモチーフを含む。

【０１１２】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、配列番号２８８、２８９、２９０、または２９１に示される保存された配列を含む。したがって、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄタンパク質は、一部の例では、配列番号２８８、２８９、２９０、または２９１に示される少なくとも１つのモチーフを含む。

【０１１３】

１つの種類の修飾または変異としては、アミノ酸を類似の生物化学的特性を有するアミノ酸残基と置換すること、すなわち、保存的置換（例えば、１～４、１～８、１～１０、または１～２０の保存的置換）が挙げられる。典型的に、保存的置換は、結果として得られるペプチドの活性にほとんど影響を及ぼさないかまたはまったく影響を及ぼさない。例えば、保存的置換は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質がｇＲＮＡ分子内のスペーサー配列に相補的な標的ＲＮＡ分子に結合するおよび／またはガイドアレイＲＮＡ転写物をｇＲＮＡ分子にプロセシングする能力に実質的に影響を及ぼさない、Ｃａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６）におけるアミノ酸置換である。アラニンスキャンを使用して、Ｃａｓ１３ｄタンパク質（例

えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６）におけるどのアミノ酸残基がアミノ酸置換を寛容することができるかを特定することができる。１つの例では、バリアントＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６）がＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系における遺伝子発現を修飾する能力は、アラニンまたは他の保存的アミノ酸が、１～４、１～８、１～１０、または１～２０個の天然のアミノ酸と置換される場合、２５％を上回って改変されない、例えば、２０％を上回って改変されない、例えば、１０％を上回って改変されない。タンパク質における本来のアミノ酸と置換することができ、保存的置換とみなされる、アミノ酸の例としては、ＳｅｒとＡｌａ；ＬｙｓとＡｒｇ；ＧｌｎまたはＨｉｓとＡｓｎ；ＧｌｕとＡｓｐ；ＳｅｒとＣｙｓ；ＡｓｎとＧｌｎ；ＡｓｐとＧｌｕ；ＰｒｏとＧｌｙ；ＡｓｎまたはＧｌｎとＨｉｓ；ＬｅｕまたはＶａｌとＩｌｅ；ＩｌｅまたはＶａｌとＬｅｕ；ＡｒｇまたはＧｌｎとＬｙｓ；ＬｅｕまたはＩｌｅとＭｅｔ；Ｍｅｔ、Ｌｅｕ、またはＴｙｒとＰｈｅ；ＴｈｒとＳｅｒ；ＳｅｒとＴｈｒ；ＴｙｒとＴｒｐ；ＴｒｐまたはＰｈｅとＴｙｒ；およびＩｌｅまたはＬｅｕとＶａｌが挙げられる。

【０１１４】

挿入、置換、または欠失に特に適した領域を特定するための１つの方法は、オルソログ間で低い保存レベルを呈するアミノ酸のストレッチを標的にすることである。そのような領域は、図１Ｂに提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質のアライメントの保存グラフに示されている。Ｃａｓ１３ｄの保存された残基は、図１８Ａ～１８ＭＭＭに提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質アライメントにおいてさらに示されている（アライメントした保存された残基の下に、記号「．」、「：」、または「＊」で示される）。欠失の例およびそれらの機能性試験は、さらに、図１６Ａ～１６Ｂに提供されている。そのような方法を使用し

て、配列番号２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、および２８５に示されるＣａｓ１３ｄの機能性欠失バリアントを生成した。バリアントなどは、例えば、１～３０、１～２０、または５～３０のアミノ酸置換、例えば、保存的アミノ酸置換をさらに含み得るか、または変更する。

【０１１５】

別の種類の置換は、１つのオルソログの部分を、別のオルソログの相同性領域と入れ替えて、組合せの「キメラ」タンパク質を得ることによって、達成することができる。そのようなキメラタンパク質は、複数のＣａｓ１３ｄオルソログの望ましい特性を組み合わせることができる。

【０１１６】

より実質的な変更は、保存性の低い置換を使用すること、例えば、（ａ）置換の範囲における、例えば、シートもしくはヘリックス構成としてのポリペプチド骨格の構造、（ｂ）標的部位におけるポリペプチドの電荷もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖のかさ高さを維持することに対するそれらの作用がより顕著に異なる残基を選択することによって、行うことができる。一般に、ポリペプチド機能に最も大きな変更をもたらすことが予測される置換は、（ａ）親水性残基、例えば、セリンまたはスレオニンが、疎水性残基、例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、またはアラニンと（またはそれによって）置換されるもの、（ｂ）システインまたはプロリンが、任意の他の残基と（またはそれによって）置換されるもの、（ｃ）正電荷の側鎖を有する残基、例えば、リシン、アルギニン、またはヒスチジンが、負電荷の残基、例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸と（またはそれによって）置換されるもの、または（ｄ）かさ高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を有さないもの、例えば、グリシンと（またはそれによって）置換されるものである。

【０１１７】

したがって、本開示は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄタンパク質、またはそれらの組合せ（例えば、キメラ）を提供する。

【０１１８】

１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、天然に存在しないアミノ酸を含む。

【０１１９】

２．他のエレメントを有するＣａｓ１３ｄタンパク質

Ｃａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、

３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６のうちのいずれか）は、例えば、Ｎ末端またはＣ末端（または両方）に、他のエレメントまたはドメインを含み得る。結果として得られるタンパク質は、Ｃａｓ１３ｄ融合タンパク質と称することができる。

【０１２０】

１つの例では、本明細書において提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、天然のＣａｓ１３ｄ、短縮型Ｃａｓ１３ｄ、または変異型ＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄ）は、細胞内局在化シグナルを含む。例示的な細胞内局在化シグナルとしては、小器官局在化シグナル、例えば、核局在化シグナル（ＮＬＳ）、核外輸送シグナル（ＮＥＳ）、またはミトコンドリア局在化シグナルが挙げられる。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、ＮＬＳ、例えば、ＳＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳ（配列番号２５６；例えば、ＡＧＣＣＣＡＡＧＡＡｇＡＡＧＡＧａＡＡＧＧＴＧＧＡＧＧＣＣＡＧＣ、配列番号２５７によってコードされる）またはＧＰＫＫＫＲＫＶＡＡＡ（ＳＶ４０大型Ｔ抗原ＮＬＳ、配列番号２５８；例えば、ｇｇａｃｃｔａａｇａａａａａｇａｇｇａａｇｇｔｇｇｃｇｇｃｃｇｃｔ、配列番号２６０によってコードされる）を含む。Ｃａｓ１３ｄタンパク質の一部となり得る例示的なＮＥＳとしては、アデノウイルス５型Ｅ１Ｂ核外輸送配列、ＨＩＶ核外輸送配列（例えば、配列番号２８７を参照されたい）、ＭＡＰＫ核外輸送配列、またはＰＴＫ２核外輸送配列が挙げられる。

【０１２１】

一部の例では、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、天然のＣａｓ１３ｄ、短縮型Ｃａｓ１３ｄ、または変異型ＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄ）は、さらに、１つまたは複数のエフェクタードメインを含む。例示的なエフェクタードメインとしては、タンパク質および／または酵素、例えば、ＲＮＡを切断することができるもの（例えば、ＰＩＮエンドヌクレアーゼドメイン、ＮＹＮドメイン、ＳＯＴ１に由来するＳＭＲドメイン、またはブドウ球菌ヌクレアーゼに由来するＲＮａｓｅドメイン）、ＲＮＡの安定性に影響を及ぼし得るもの（例えば、トリステトラプロリン（ＴＴＰ）、またはＵＰＦ１、ＥＸＯＳＣ５、およびＳＴＡＵ１に由来するドメイン）、ヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを編集することができるもの（例えば、シチジンデアミナーゼ、ＰＰＲタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、ＡＤＡＲファミリータンパク質、またはＡＰＯＢＥＣファミリータンパク質）、翻訳を活性化することができるもの（例えば、ｅＩＦ４Ｅおよび他の翻訳開始因子、酵母ポリ（Ａ）結合タンパク質のドメイン、またはＧＬＤ２）、翻訳を抑制することができるもの（例えば、ＰｕｍｉｌｉｏまたはＦＢＦ　ＰＵＦタンパク質、デアデニラーゼ、ＣＡＦ１、アルゴノートタンパク質）、ＲＮＡをメチル化することができるもの（例えば、ＭＥＴＴＬ１４、ＭＥＴＴＬ３、またはＷＴＡＰなどのｍ６Ａメチルトランスフェラーゼ因子に由来するドメイン）、ＲＮＡを脱メチル化することができるもの（例えば、ヒトアルキル化修復ホモログ５またはＡｌｋｂｈ５）、スプライシングに影響を及ぼすことができるもの（例えば、ＳＲＳＦ１のＲＳリッチドメイン、ｈｎＲＮＰ　Ａ１のＧｌｙリッチドメイン、ＲＢＭ４のアラニンリッチモチーフ、またはＤＡＺＡＰ１のプロリンリッチモチーフ）、親和性精製または免疫沈降を可能にすることができる

もの（例えば、ＦＬＡＧ、ＨＡ、ビオチン、またはＨＡＬＯタグ）、ならびに近傍性に基づくタンパク質の標識化および特定を可能にすることができるもの（例えば、標的ＲＮＡと相互作用するタンパク質をビオチン標識するためのビオチンリガーゼ（例えば、ＢｉｒＡ）またはペルオキシダーゼ（例えば、ＡＰＥＸ２））が挙げられる。

【０１２２】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質およびエフェクターモジュールの組合せにより、転写センサーを構築することができる。例えば、転写センサーは、変異型ＨＥＰＮドメインを有する少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）、標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有する少なくとも１つのｇＲＮＡ、およびエフェクターモジュール、例えば、必要に応じてスプリットされる蛍光タンパク質またはプローブ（例えば、スプリットＶｅｎｕｓ蛍光タンパク質、スプリットＧＦＰ、スプリット強ＧＦＰ、スプリットｍＣｈｅｒｒｙ、スプリットスーパーフォルダーｍＣｈｅｒｒｙ、および他の蛍光タンパク質バリアント、例えば、ＥＣＦＰ、ＹＦＰ、ＲＦＰ、ならびにそれらの誘導体または断片）、必要に応じてスプリットされる発光タンパク質またはプローブ（例えば、Ｇａｕｓｓｉａ、Ｆｉｒｅｆｌｙ、ＮａｎｏＬｕｃ、またはＲｅｎｉｌｌａバリアント）、必要に応じてスプリットされる酵素（例えば、ユビキチンまたはＴＥＶプロテアーゼ）、ＦＲＥＴ適合性タンパク質対、切断可能なリンカーを介してＣａｓ１３ｄに融合された１つまたは複数の転写因子（例えば、人工ＧＡＬ４、亜鉛フィンガー、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１、またはＴｅｔＲに基づく転写因子、または内因性転写因子）、転写因子など、タンパク質をトランスでスプライシングしてその機能を修復するスプリットインテイン（例えば、Ｒｈｏｄｏｔｈｅｒｍｕｓ ｍａｒｉｎｕｓまたはＤｎａＥに由来するインテイン）、リン酸化により活性化するキナーゼ－基質対（例えば、ＴＹＫ２－ＳＴＡＴ３）、二量体化または多量体化により活性化する１つ、２つ、もしくはそれよりも多くの単量体（例えば、カスパーゼ９）、または相互作用により構造的および機能的変化を誘導する１つまたは複数のタンパク質から構成され得る。１つの例では、特定の転写物への結合に起因する２つまたはそれよりも多くのＣａｓ１３ｄタンパク質およびｇＲＮＡの空間的近接性は、エフェクターモジュールを活性化させ、細胞における検出可能なシグナルまたは検出可能な活性をもたらす。

【０１２３】

１つの例では、エフェクタードメインは、ＲＮＡアプタマー、例えば、ｇＲＮＡ分子に付属するかまたはそこに挿入され得るもの（例えば、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、および他のアプタマー）を特異的に認識し、それに結合するタンパク質に融合される。このアプタマー－エフェクタードメイン融合体は、Ｃａｓ１３ｄおよびｇＲＮＡ複合体が、アプタマータンパク質－エフェクタードメインを、標的ＲＮＡの近傍に誘導するため、標的ＲＮＡを標的にするために使用することができる。

【０１２４】

別の例では、フルオロフォアアプタマー（例えば、Ｓｐｉｎａｃｈ、Ｍａｎｇｏなど）など、アプタマーは、標的ＲＮＡの検出を可能にするために、ｇＲＮＡ分子に直接的に挿入することができる。

【０１２５】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質（例えば、天然のＣａｓ１３ｄ、短縮型Ｃａｓ１３ｄ、または変異型ＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄ）は、精製タグ、例えば、ＨＡタグ、Ｈｉｓタグ（例えば、６－Ｈｉｓ）、Ｍｙｃタグ、Ｅタグ、Ｓタグ、カルモジュリンタグ、ＦＬＡＧタグ、ＧＳＴタグ、ＭＢＰタグなどを含む。そのようなタグは、一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質のＮ末端またはＣ末端にある。

【０１２６】

一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質（例えば、天然のＣａｓ１３ｄ、短縮型Ｃａｓ１３ｄ、または変異型ＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄ）は、１つまたは複数の細胞内局在化シグナル、エフェクタードメイン、および精製タグを含む。

【０１２７】
一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、複数の断片にスプリットされ得、これが、次いで、個別に発現される。Ｃａｓ１３ｄのそのような断片は、必要に応じて、他のタンパク質ドメインに融合されてもよい。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄは、半分ずつ２つにスプリットされ得、これが、次いで、誘導性ヘテロ二量体対の２つの部分に融合される。ヘテロ二量体結合の誘導の際に、Ｃａｓ１３ｄの半分ずつが、互いに動員されて、活性タンパク質が形成される。そのような系は、Ｃａｓ１３ｄ活性の誘導的制御を可能にするであろう。有用なヘテロ二量体対は、とりわけ、光照射によってかまたは小分子化合物の投与を通じて二量体化する、２つのタンパク質を含む。ヘテロ二量体対の具体的な例としては、光誘導性Ｍａｇｎｅｔタンパク質、光誘導性ｉＬＩＤ－ＳｓｐＢ対、光誘導性Ｃｒｙｐｔｏｃｈｒｏｍｅ２－ＣＩＢ１二量体、および小分子誘導性ＦＫＢＰタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。スプリットＣａｓ１３ｄ設計の別の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質の半分ずつ２つが、タンパク質トランススプライシングドメインに融合され得る。そのような設計により、半分ずつ２つを別個に発現させ、それを、細胞内で発現させた後に全長タンパク質に再構成することが可能となるであろう。そのようなトランススプライシングドメインの例としては、インテイン系が挙げられる。

【０１２８】
タンパク質のスプリットに特に適した領域を特定するための１つの方法は、オルソログ間で低い保存レベルを呈するアミノ酸のストレッチを特定することである。そのような領域は、図１Ｂに提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質のアライメントの保存グラフに示されている。Ｃａｓ１３ｄの保存された残基の領域は、図１８Ａ～１８ＭＭＭに提供されるＣａｓ１３ｄタンパク質アライメントにおいてさらに示されている（アライメントした保存された残基の下に、記号．、：、または＊で示される）。

【０１２９】
３．Ｃａｓ１３ｄタンパク質の生成
１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、例えば、原核生物細胞（例えば、細菌、例えば、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、およびＣｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、古細菌細胞、植物もしくは植物細胞、真菌細胞（例えば、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）、酵母細胞（例えば、ＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓまたはＰｉｃｈｉａ（例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたは Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓ）、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　ｌａｃｔｉｓ）、昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）、または哺乳動物細胞（例えば、２９３細胞、または不死化哺乳動物骨髄およびリンパ系細胞株）において、発現される。発現されると、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、単離および／または精製され得る（例えば、クロマトグラフィーまたは免疫学的分離を使用して）。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質上のタグにより、培養培地からのタンパク質の単離が可能である。例示的な手順としては、硫酸アンモニウム沈降、親和性カラム、カラムクロマトグラフィーなどが挙げられる（概して、R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982を参照されたい）。少なくとも約９０～９５％の均質性、例えば、９８％～９９％の均質性の実質的に純粋な組成物を、本明細書において提供される方法において使用することができる。例えば、Ｃａｓ１３ｄタンパク質の精製された調製物は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系において核酸分子からＣａｓ１３ｄタンパク質を発現するための代替策として使用することができる。

【０１３０】
組換え方法に加えて、本明細書に開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質はまた、天然の化学的ライゲーションおよび／または発現されたタンパク質のライゲーションを使用して、全体または部分的に構築することができる。

【０１３１】
Ｂ．Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸分子

Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸分子は、本開示によって包含される。核酸分子は、Ｃａｓ１３ｄペプチドをコードするＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、およびＲＮＡ配列を含む。そのような核酸分子には、天然に存在するかまたは天然に存在しない、ヌクレオチドまたはリボヌクレオチドが含まれ得る。配列番号１、３、４２、６２、７０、８２、８３、９２、および１０４の新規なＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする例示的な核酸分子は、配列番号１２４～１２８、１３９、１４０、および１４１に示される。新規なＣａｓ１３ｄタンパク質をコードするコドン最適化された核酸分子、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞における発現のために最適化されたものもまた、提供される（配列番号１１４～１２３および１４２～１４５）。例えば、配列番号１１４、１１８、および１２２は、ヒト細胞における発現のために最適化された核酸分子を提供する。配列番号１１５、１１９、および１２３は、ヒト細胞における発現のために最適化されており、変異体ＨＥＰＮ部位をコードする、核酸分子を提供する。配列番号１１６および１２０は、ヒト細胞における発現のために最適化されており、Ｎ末端核局在化（ＮＬＳ）コード配列（すなわち、ＳＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳ）を含む、核酸分子を提供する。配列番号１１７および１２１は、ヒト細胞における発現のために最適化されており、Ｎ末端およびＣ末端のＮＬＳコード配列（すなわち、それぞれ、ＳＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳ、配列番号２５６、およびＧＰＫＫＫＲＫＶＡＡＡ配列番号２５８）を含む、核酸分子を提供する。

【０１３２】

１つの例では、核酸配列は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６に対して少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、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９９％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする。そのような核酸配列は、本明細書において提供されるアミノ酸配列、および遺伝子コードに基づいて、生成され得る。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄ核酸配列は、配列番号１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１３９、１４０、または１４１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％の配列同一性を有する。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄ核酸配列は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞における発現のために最適化されており、例えば、配列番号１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１４２、１４３、１４４、または１４５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％の配列同一性を有するものである。

【０１３３】

当業者であれば、機能的に同等の核酸、例えば、配列は異なるが同じＣａｓ１３ｄタンパク質配列をコードする核酸を含有する、様々なクローンを容易に構築することができる

。コード配列におけるサイレント変異は、遺伝子コードの縮重（すなわち、冗長性）から生じ、それによって、１つを上回るコドンが、同じアミノ酸残基をコードし得る。したがって、例えば、ロイシンは、ＣＴＴ、ＣＴＣ、ＣＴＡ、ＣＴＧ、ＴＴＡ、またはＴＴＧによってコードすることができ、セリンは、ＴＣＴ、ＴＣＣ、ＴＣＡ、ＴＣＧ、ＡＧＴ、またはＡＧＣによってコードすることができ、アスパラギンは、ＡＡＴまたはＡＡＣによってコードすることができ、アスパラギン酸は、ＧＡＴまたはＧＡＣによってコードすることができ、システインは、ＴＧＴまたはＴＧＣによってコードすることができ、アラニンは、ＧＣＴ、ＧＣＣ、ＧＣＡ、またはＧＣＧによってコードすることができ、グルタミンは、ＣＡＡまたはＣＡＧによってコードすることができ、チロシンは、ＴＡＴまたはＴＡＣによってコードすることができ、イソロイシンは、ＡＴＴ、ＡＴＣ、またはＡＴＡによってコードすることができる。標準的な遺伝子コードを示す表は、様々な出典において見出すことができる（例えば、Stryer, 1988, Biochemistry, 3rd Edition, W.H. Freeman and Co., NYを参照されたい）。

【０１３４】

遺伝子コードに基づいて、任意のＣａｓ１３ｄ配列をコードする核酸配列を、生成することができる。一部の例では、そのような配列は、宿主または標的細胞、例えば、Ｃａｓ１３ｄタンパク質を発現させるために使用される宿主細胞、または開示され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）における発現のために、最適化されている。特定の種に関するコドン優先度およびコドン使用頻度の表を使用して、Ｃａｓ１３ｄをコードする単離された核酸分子（例えば、その特定の種のコドン使用優先度を利用する、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１または２５３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％の配列同一性を有するタンパク質をコードするもの）を操作することができる。例えば、本明細書に開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質は、目的の特定の生物によって優先的に使用されるコドンを有するように設計することができる。１つの例では、Ｃａｓ１３ｄ核酸配列は、ヒト細胞における発現のために最適化されており、例えば、配列番号１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１４２、１４３、１４４、または１４５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％の配列同一性を有するものである。

【０１３５】

Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、

６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するタンパク質をコードするもの）は、ｉｎ ｖｉｔｒｏ方法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、転写に基づく増幅系（ＴＡＳ）、自己持続性配列複製系（３ＳＲ）、およびＱβレプリカーゼ増幅系（ＱＢ）によって、クローニングまたは増幅させることができる。加えて、Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するタンパク質をコードするもの）は、クローニング技法によって調製することができる。適切なクローニングおよびシーケンシング技法、ならびに当業者にクローニングの指示を行うのに十分な説明の例は、Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, N. Y., 1989およびAusubel et al., (1987) in "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley and Sons, New York, N.Y.に見出される。

【０１３６】

Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸配列（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１

００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するタンパク質をコードするもの）は、例えば、適切な配列のクローニング、またはNarang et al., Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979のホスホトリエステル方法、Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979のホスホジエステル方法、Beaucage et al., Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981のジエチルホスホラミダイト方法、例えば、例としてNeedham-VanDevanter et al., Nucl. Acids Res. 12:6159-6168, 1984に記載されている自動化合成装置を使用するBeaucage & Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862, 1981によって記載されている固相ホスホラミダイトトリエステル方法、および米国特許第４，４５８，０６６号の固体支持体方法などの方法による直接的な化学合成によるものを含む、任意の好適な方法によって、調製することができる。化学合成により、一本鎖オリゴヌクレオチドを産生する。これを、相補的な配列とのハイブリダイゼーションによって、またはこの一本鎖を鋳型として使用したＤＮＡポリメラーゼによる重合によって、二本鎖ＤＮＡに変換することができる。当業者であれば、ＤＮＡの化学合成が、一般に、約１００塩基の配列に限定されるが、より長い配列を、より短い配列のライゲーションによって得ることができることを、認識するであろう。

【０１３７】

１つの例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するタンパク質）は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードするｃＤＮＡをプラスミドまたはベクターに挿入することによって調製される。挿入は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質がフレームで読み取られ、Ｃａｓ１３ｄタンパク質が産生されるように、行うことができる。

【０１３８】

Ｃａｓ１３ｄ核酸コード配列（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３

６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するもの）は、配列の挿入または組込みを可能にするように操作することができ、原核生物または真核生物のいずれかにおいて発現させることができる、プラスミド、ウイルス、または他のビヒクルを含むがこれらに限定されない、発現ベクターに挿入することができる。宿主としては、微生物、酵母、昆虫、植物、および哺乳動物生物を挙げることができる。ベクターは、選択可能なマーカー、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子または抗生物質耐性遺伝子をコードし得る。

【０１３９】

Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸配列（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するタンパク質をコードするもの）は、発現制御配列に動作可能に連結していてもよい。Ｃａｓ１３ｄコード配列に動作可能に連結した発現制御配列は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質コード配列の発現が、発現制御配列と適合性のある条件下において達成されるように、ライゲーションされる。発現制御配列としては、適切なプロモーター、エンハンサー、転写終結因子、Ｃａｓ１３ｄタンパク質コーディング遺伝子の前の開始コドン（すなわち、ＡＴＧ）、イントロンのスプライシングシグナル、ｍＲＮＡの適切な翻訳を可能にするためのその遺伝子の正しいリーディングフレームの維持、および終止コドンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４０】

一実施形態では、ベクターは、酵母、例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｐ．ｐａｓ

ｔｏｒｉｓ、またはＫｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　ｌａｃｔｉｓにおける発現に使用される。酵母発現系において使用するための例示的なプロモーターとしては、構成的プロモーター、形質膜Ｈ$^{+}$－ＡＴＰａｓｅ（ＰＭＡ１）、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）、ホスホグリセリン酸キナーゼ－１（ＰＧＫ１）、アルコールデヒドロゲナーゼ－１（ＡＤＨ１）、および多面的薬物耐性ポンプ（ＰＤＲ５）が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、多数の誘導性プロモーター、例えば、ＧＡＬ１－１０（ガラクトースによって誘導される）、ＰＨＯ５（低細胞外無機リン酸によって誘導される）、およびタンデム熱ショックＨＳＥエレメント（３７℃への温度上昇によって誘導される）が有用である。滴定可能な誘導因子に応答して変動性の発現を指示するプロモーターとしては、メチオニン応答性ＭＥＴ３およびＭＥＴ２５プロモーター、ならびに銅依存性ＣＵＰ１プロモーターが挙げられる。これらのプロモーターのいずれも、多重コピー（２μ）または単一コピー（ＣＥＮ）プラスミドにクローニングして、発現レベルにおけるさらなるレベルの制御をもたらすことができる。プラスミドは、酵母における選択のための栄養マーカー（例えば、ＵＲＡ３、ＡＤＥ３、ＨＩＳ１、およびその他）、および細菌における繁殖のための抗生物質耐性（ＡＭＰ）を含み得る。Ｋ．ｌａｃｔｉｓにおける発現のためのプラスミド、例えば、ｐＫＬＡＣ１が、公知である。

【０１４１】

Ｃａｓ１３ｄをコードするウイルスベクター（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５、または２９６）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％の配列同一性を有するタンパク質をコードするもの）もまた、調製することができる。例示的なウイルスベクターとしては、ポリオーマ、ＳＶ４０、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ＨＳＶおよびＥＢＶを含むヘルペスウイルス、レンチウイルス、シンドビスウイルス、アルファウイルス、ならびにトリ、ネズミ科動物、およびヒト起源のレトロウイルスが挙げられる。バキュロウイルス（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多角体病ウイルス、ＡｃＭＮＰＶ）ベクターを使用することができ、これは、市販の供給源から入手することができる。他の好適なベクターとしては、レトロウイルスベクター、オルソポックスベクター、トリポックスベクター、鶏痘ベクター、カプリポックスベクター、ブタポックスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、およびポリオウイルスベクターが挙げられる。特定の例示的なベクターは、ポックスウイルスベクター、例えば、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、および高度に減弱化されたワクシニアウイルス（ＭＶＡ）、アデノウイルス、バキュロウイルスなどである。有用なポックスウイルスとしては、オルソポックス、ブタポックス、トリポックス、およびカプリポックスウイルスが挙げられる。オルソポ

ックスには、ワクシニア、欠肢症、およびアライグマポックスが挙げられる。有用なオルソポックスの１つの例は、ワクシニアである。トリポックスとしては、鶏痘、カナリア痘、および鳩痘が挙げられる。カプリポックスとしては、山羊痘および羊痘が挙げられる。１つの例では、ブタポックスは、豚痘である。使用することができる他のウイルスベクターとしては、他のＤＮＡウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルスおよびアデノウイルス、ならびにＲＮＡウイルス、例えば、レトロウイルスおよびポリオが挙げられる。

【０１４２】

Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードするウイルスベクター（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するタンパク質をコードするもの）は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸配列に操作可能に連結された少なくとも１つの発現制御エレメントを含み得る。発現制御エレメントは、Ｃａｓ１３ｄ核酸配列の発現を制御および調節する。使用することができる例示的な発現制御エレメントとしては、ｌａｃ系、ファージラムダのオペレーターおよびプロモーター領域、酵母プロモーター、ならびにポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルス、またはＳＶ４０に由来するプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。１つの例では、プロモーターは、ＣＭＶ、Ｕ６、ＣＢｈ、ＣＭＷ、Ｃｂｈ、ＥＦ１ａである。１つの例では、プロモーターは、細胞型特異的プロモーター、例えば、シナプシンもしくはＧＦＡＰ、または誘導性プロモーター、例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーターである。追加の操作エレメントとしては、リーダー配列、終結コドン、ポリアデニル化シグナル、ならびに宿主系におけるＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸配列の適切な転写およびそれに続く翻訳に必要とされる任意の他の配列が挙げられるが、これらに限定されない。発現ベクターは、宿主系における核酸配列を含有する発現ベクターの移入およびそれに続く複製に必要とされる追加のエレメントを含有し得る。そのようなエレメントの例としては、複製起点および選択可能なマーカーが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４３】

１つの例では、ベクターは、Ｃａｓ１３ｄタンパク質コード配列の後のポリＡシグナル、ウイルスベクターにおける発現のためのＷＰＲＥシグナル、またはこれらの組合せを含む。

【０１４４】

１つの例では、方法は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質をコードするｍＲＮＡの直接的な送達を使用する。

【０１４５】

Ｃ．ガイド核酸分子

本開示は、本明細書で提供される方法、組成物およびキットにおいて使用され得るガイド核酸分子、例えば、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡまたはｃｒＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ（ガイド）ＲＮＡ）を提供する。かかる分子は、天然に存在するまたは天然に存在しないヌクレオチドまたはリボヌクレオチド（例えば、例えばガイドＲＮＡを分解から保護するための、ＬＮＡまたは他の化学的改変ヌクレオチドまたはリボヌクレオチド）を含み得る。一部の例では、ガイド配列は、ＲＮＡである。ガイド核酸は、改変された塩基または化学的改変を含み得る（例えば、Latorre et al., Angewandte Chemie 55:3548-50, 2016を参照のこと）。ガイド配列は、Ｃａｓ１３ｄタンパク質を標的ＲＮＡに指向させ、それによって、ＲＮＡを標的にする（例えば、ＲＮＡを改変または検出する）。

【０１４６】

ガイド分子は、スペーサーと呼ばれる１つまたは複数の領域を含む。スペーサーは、標的ＲＮＡとハイブリダイズし、標的ＲＮＡへのＣａｓ１３ｄタンパク質の配列特異的結合を指示するのに十分な、標的ＲＮＡ配列との相補性を有する。したがって、スペーサーは、ガイド配列の可変性の部分である。一部の例では、スペーサーは、標的ＲＮＡ（または標的化されるＲＮＡの領域）に対する１００％の相補性を有するが、スペーサーは、標的ＲＮＡに対して１００％未満の相補性、例えば、標的ＲＮＡに対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相補性を有し得る。

【０１４７】

ガイド配列は、１つまたは複数のダイレクトリピート（ＤＲ）もまた含み得る。ＤＲは、ガイドの不変の部分であり、Ｃａｓ１３ｄタンパク質とガイド分子との間の相互作用を促進する強い二次構造を含有する（図３Ｃ）。各オルソログは、わずかに異なるＤＲ配列（例えば、配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５４、１５６、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７および１６９）を有する。一例では、ｇＲＮＡは、配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１４８、１５０、１５１、１５２、１５４、１５６、１５７、１５９、１６１、１６３、１６５、１６７、１６９、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９１、１９２、１９３、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５、２１７、２１９、２２１、２２３、２２５、２２７、２２８、２３０、２３２、２３４、２３６、２３８、２４０、２４２、２４４、２４６、２４８、２５０、２５２または２５４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％の配列同一性を有する少なくとも１つのＤＲ配列（例えば、かかるＤＲ配列のうち１、２、３または４つ）を含む。

【０１４８】

一例では、ガイド配列は、その５’末端に一定のＤＲを、その３’末端に可変性のスペーサーを含む。一例では、配列ＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサーを含む。一部の例では、配列ＤＲ－スペーサーは、２回またはそれよりも多く、例えば、少なくとも３回または少なくとも４回、反復される。この型の配列は、ガイドアレイと呼ばれる。

【０１４９】

ガイド分子は一般に、プロセシングの種々の状態で存在する。一例では、プロセシングされていないガイドＲＮＡは、３６ｎｔのＤＲとその後の３０～３２ｎｔのスペーサーである。ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ１３ｄ自体または他のＲＮａｓｅによって、より短い「成熟」形態へとプロセシング（短縮／改変）される。一部の実施形態では、プロセシングされていないガイド配列は、約、または少なくとも約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５またはそれよりも多くのヌクレオチド（ｎｔ）長である。一部の実施形態では、プロセシングされたガイド配列は、約４４～６０ｎｔ（例えば、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５

、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９または７０ｎｔ）である。一部の実施形態では、プロセシングされていないスペーサーは、約２８～３２ｎｔ長（例えば、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４または３５ｎｔ）であるが、成熟（プロセシングされた）スペーサーは、約１０～３０ｎｔ、１０～２５ｎｔ、１４～２５ｎｔ、２０～２２ｎｔまたは１４～３０ｎｔ（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４または３５ｎｔ）であり得る。一部の実施形態では、プロセシングされていないＤＲは、約３６ｎｔ（例えば、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０または４１ｎｔ）であるが、プロセシングされたＤＲは、約３０ｎｔ（例えば、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４または３５ｎｔ）である。

【０１５０】

ガイド配列がＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ＲＮＡへの配列特異的結合を指示する能力は、任意の適切なアッセイによって評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するのに十分なＣＲＩＳＰＲ系の構成成分は、例えば、ＣＲＩＳＰＲ配列の構成成分をコードするベクターによるトランスフェクションによって、対応する標的ＲＮＡ分子を有する宿主細胞に提供され、その後、標的配列内の優先的な切断が評価され得る。同様に、標的ＲＮＡ配列の切断は、標的ＲＮＡ、試験されるガイド配列を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体の構成成分、および試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を提供すること、ならびに試験ガイド配列反応と対照ガイド配列反応との間で、標的ＲＮＡにおける結合、または切断の速度を比較することによって、試験管中で評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者に想起される。

【０１５１】

ガイド核酸分子を含むベクター、例えば、ウイルスベクターまたはプラスミド（例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたは単純ヘルペスウイルス）もまた提供される。例示的なベクターは、本明細書に記載される。一部の例では、ガイド核酸分子は、プロモーターまたは発現制御エレメント（その例は、本出願の他の場所で提供される）に作動可能に連結している。本明細書の他の場所に記載されるように、かかるベクターは、他のエレメント、例えば、選択可能なマーカー、例えば抗生物質、例えば、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、または検出可能なマーカー、例えば、ＧＦＰもしくは他のフルオロフォアをコードする遺伝子を含み得る。

【０１５２】

一例では、複数のｇＲＮＡは、アレイ（これは、ベクター、例えば、ウイルスベクターまたはプラスミドの一部であり得る）の一部である。例えば、配列ＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサー－ＤＲ－スペーサーを含むガイドアレイは、３つの独自のプロセシングされていないｇＲＮＡ（各ＤＲ－スペーサー配列について１つ）を含み得る。細胞または無細胞系中に導入されると、アレイは、Ｃａｓ１３ｄタンパク質によって、３つの個々の成熟ｇＲＮＡへとプロセシングされる。これは、例えば、複数の標的ＲＮＡ、または単一の標的ＲＮＡ内の複数の位置（またはそれらの組合せ）を標的にするための、細胞または系への複数のｇＲＮＡの送達の多重化を可能にする。

【０１５３】

Ｄ．Ｃａｓ１３ｄおよびガイド核酸分子をコードするベクター

本開示は、１つまたは複数のガイド分子コード配列（例えば、１つまたは複数のＲＮＡ分子の標的化を可能にするため）および１つまたは複数のＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列を含むベクター、例えば、本明細書の他の場所に記載されるプラスミドおよびウイルスベクターを提供する。かかるベクターは、本明細書で提供される方法、組成物およびキットにおいて使用され得る。かかるベクターは、天然に存在するまたは天然に存在しないヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含み得る。かかるベクターは、ガイド分子（これは、少なくとも２つの異なるガイド分子を含むアレイの一部であり得る）およびＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列に作動可能に連結した単一のプロモーターを含み得る。あるい

は、ガイド分子（これは、少なくとも２つの異なるガイド分子を含むアレイの一部であり得る）およびＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列は、異なるプロモーターに作動可能に連結していてもよい。一部の例では、ガイド分子（これは、少なくとも２つの異なるガイド分子を含むアレイの一部であり得る）およびＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列は、プロモーター、エンハンサーまたはそれら両方に作動可能に連結している。

【０１５４】

Ｅ．組換え細胞および無細胞系

非ネイティブＣａｓ１３ｄタンパク質、非ネイティブＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、ガイド分子（またはコード配列）、またはそれらの組合せを含む細胞が提供される。かかる組換え細胞は、本明細書で提供される方法、組成物およびキットにおいて使用され得る。本明細書で開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質をコードする核酸分子および／またはガイド分子をコードする核酸分子は、形質転換された（例えば、組換え）細胞を生成するために、細胞中に導入され得る。一部の例では、かかる細胞は、１つまたは複数の非ネイティブＣａｓ１３ｄタンパク質および１つまたは複数のガイド分子（例えば、ｇＲＮＡ）を、例えば、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体として、細胞中に導入することによって生成される。

【０１５５】

同様に、Ｃａｓ１３ｄタンパク質、Ｃａｓ１３ｄタンパク質コード配列、ガイド分子（またはコード配列）、またはそれらの組合せを含む無細胞系、例えば、溶解された細胞から生成されたもの（またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写されたまたは化学的に合成された標的ＲＮＡが添加される試験管または他の容器中にＣａｓ１３ｄ　ＲＮＰを含むもの）が提供される。かかる無細胞系は、本明細書で提供される方法、組成物およびキットにおいて使用され得る。一部の例では、１つまたは複数の非ネイティブＣａｓ１３ｄタンパク質および１つまたは複数のガイド分子（例えば、ｇＲＮＡ）は、例えば、ＲＮＰ複合体として、無細胞系に添加される。

【０１５６】

したがって、Ｃａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１３８、１４７、１４９、１５３、１５５、１５８、１６０、１６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７５、１７７、１７９、１８１、１８３、１８５、１８７、１８９、１９４、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２０、２２２、２２４、２２６、２２９、２３１、２３３、２３５、２３７、２３９、２４１、２４３、２４５、２４７、２４９、２５１、２５３、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２９２、２９３、２９４、２９５または２９６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％の配列同一性を有するタンパク質）を含有する細胞および無細胞系が、開示される。同様に、ガイド分子、例えば、配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６または１３７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％の配列同一性を有する少なくとも１つのＤＲ配列を有するもの、および一部の例では、標的ＲＮＡに対して相補的な少なくとも１つのスペーサー

配列も含有する細胞および無細胞系が提供される。

【０１５７】

かかる組換え細胞（例えば、これは、無細胞系を生成するために使用され得る）は、真核生物または原核生物であり得る。かかる細胞の例には、細菌、古細菌、植物、真菌、酵母、昆虫および哺乳動物細胞、例えば、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、ＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓまたはＰｉｃｈｉａ（例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたは Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓ）、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ細胞、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ細胞、Ｘｅｎｏｐｕｓ細胞、ＳＦ９細胞、Ｃ１２９細胞、２９３細胞、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａおよび不死化哺乳動物細胞系（例えば、Ｈｅｌａ細胞、骨髄性細胞系およびリンパ系細胞系）が含まれるがこれらに限定されない。

【０１５８】

一例では、細胞は、原核生物細胞、例えば細菌細胞、例えばＥ．ｃｏｌｉである。

【０１５９】

一例では、細胞は、真核生物細胞、例えば哺乳動物細胞、例えばヒト細胞である。一例では、細胞は、初代真核生物細胞、幹細胞、腫瘍／がん細胞、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）、血液細胞（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、Ｔｒｅｇなど）、造血幹細胞、特殊化した免疫細胞（例えば、腫瘍浸潤性リンパ球または腫瘍抑制されるリンパ球）、腫瘍微小環境中の間質細胞（例えば、がん関連線維芽細胞など）である。一例では、細胞は、中枢神経系または末梢神経系の脳細胞（例えば、ニューロン、アストロサイト、ミクログリア、網膜神経節細胞、杆体／錐体など）である。

【０１６０】

一例では、細胞は、生体試料、例えば、対象から取得された、ゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）、タンパク質、またはそれらの組合せを含有する生体検体の一部である（またはそれから取得される）。例には、末梢血、血清、血漿、尿、唾液、痰、組織生検、細針吸引物、手術検体および剖検材料が含まれるがこれらに限定されない。かかる細胞は、無細胞系を生成するためにも使用され得る。

【０１６１】

一例では、細胞（または無細胞系）は、腫瘍、例えば、血液学的腫瘍（例えば、急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病ならびに骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病）、慢性白血病（例えば、慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病および慢性リンパ球性白血病）を含む白血病、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（低グレード、中間グレードおよび高グレードを含む）、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、マントル細胞リンパ腫および脊髄形成異常症）または固形腫瘍（例えば、肉腫および癌腫：線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ系悪性腫瘍、膵がん、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、膀胱癌およびＣＮＳ腫瘍（例えば、神経膠腫、星細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫（craniopharyogioma）、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫（menangioma）、黒色腫、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫）由来である。

【０１６２】

一例では、細胞（または無細胞系）は、環境試料、例えば、水、土壌または空気試料から取得される。

【０１６３】

Ｆ．組成物およびキット

Ｃａｓ１３ｄタンパク質、Ｃａｓ１３ｄタンパク質コード配列、ガイド分子（またはコード配列）、またはそれらの組合せを含む組成物およびキットが提供される。一例では、組成物またはキットは、１つまたは複数のＣａｓ１３ｄタンパク質および１つまたは複数のガイド分子（例えば、ｇＲＮＡ）から構成されるＲＮＰ複合体を含む。一例では、組成物またはキットは、Ｃａｓ１３ｄタンパク質、ガイド分子、またはそれら両方をコードするベクターを含む。一例では、組成物またはキットは、非ネイティブＣａｓ１３ｄタンパク質、非ネイティブＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、ガイド分子（またはコード配列）、またはそれらの組合せを含む細胞、例えば、細菌細胞または真核生物細胞を含む。一例では、組成物またはキットは、非ネイティブＣａｓ１３ｄタンパク質、非ネイティブＣａｓ１３ｄタンパク質コード配列、ガイド分子（またはコード配列）、またはそれらの組合せを含む無細胞系を含む。

【０１６４】

かかる組成物は、薬学的に許容される担体（例えば、生理食塩水、水、グリセロール、ＤＭＳＯまたはＰＢＳ）を含み得る。一部の例では、組成物は、液体、凍結乾燥粉末であるか、または凍結保存される。

【０１６５】

一部の例では、キットは、送達系（例えば、リポソーム、粒子、エクソソーム、微細小胞、ウイルスベクターまたはプラスミド）および／または標識（例えば、細胞型特異的取込みを指示する／エンドソーム回避を増強する／血液脳関門横断を可能にするためなどに、直接Ｃａｓ１３ｄ　ＲＮＰにまたはＣａｓ１３ｄ　ＲＮＰを含有する粒子にコンジュゲートされ得るペプチドまたは抗体）を含む。一部の例では、キットは、細胞培養物または成長培地、例えば、細菌、植物、昆虫または哺乳動物細胞を成長させるのに適切な培地をさらに含む。

【０１６６】

一部の例では、キットのかかるパーツは、別々のコンテナ中にある。

【０１６７】

Ｇ．ＲＮＡを標的にする

開示されたＣａｓ１３ｄタンパク質（およびコード配列）およびガイド分子（例えば、ｇＲＮＡおよびコード配列）は、１つまたは複数のＲＮＡ分子、例えば、試料（例えば、生体試料、環境試料（例えば、土壌、空気または水試料）など）中に存在するものを標的にするために、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系において使用され得る。一例では、標的ＲＮＡは、コーディングＲＮＡである。一例では、標的ＲＮＡは、核ＲＮＡである。他の例では、標的ＲＮＡは、非コーディングＲＮＡ（例えば、機能的ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｓｃａＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡまたはｌｉｎｃＲＮＡ）である。かかるＲＮＡ標的化法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで（例えば、細胞培養物または無細胞系において）またはｉｎ　ｖｉｖｏで（例えば、生物、胚または哺乳動物において）実施され得る。

【０１６８】

本明細書で提供されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、２つの一般的な構成成分：（１）Ｃａｓ１３ｄタンパク質またはそのコード配列（その発現は、プロモーターによって駆動され得る）および（２）標的ＲＮＡに特異的なガイド核酸分子、例えばＲＮＡ（ｇＲＮＡ）（その発現もまた、プロモーターによって駆動され得る）を含む。例えば、（１）Ｃａｓ１３ｄ　ｍＲＮＡおよびＣａｓ１３ｄ　ｇＲＮＡとして、（２）単一のベクターもしくはプラスミドの一部として、または複数のベクターもしくはプラスミドへと分割されて、（３）別々のＣａｓ１３ｄタンパク質およびガイド分子として、あるいは（４）Ｃａｓ１３ｄタンパク質およびガイド分子のＲＮＰ複合体として、細胞中に（または無細胞系に）導入される場合、ガイド分子は、Ｃａｓ１３ｄを標的ＲＮＡにガイドする。Ｃａｓ１３ｄタンパク質がネイティブＨＥＰＮドメインを有する、またはＲＮａｓｅ活性を有する適切なエフェクタードメインに融合される場合、ＲＮＡは切断され得る。Ｃａｓ１３ｄタンパク

質が突然変異したＨＥＰＮドメインを有する場合、ガイドアレイは、成熟ｇＲＮＡへとプロセシングされ得るが、標的ＲＮＡは切断されない。この系を使用して、ＲＮＡ配列は、必要に応じてエフェクタードメインを用いて、容易に標的化、例えば、編集または検出される。

【０１６９】

１．細胞中への直接的なＣａｓ１３ｄタンパク質の導入

一例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、組換え細胞、例えばＥ．ｃｏｌｉにおいて発現され、精製される。次いで、得られた精製されたＣａｓ１３ｄタンパク質は、標的ＲＮＡに特異的な適切なガイド分子と共に、１つまたは複数のＲＮＡが標的化され得る細胞または生物中に導入される。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質およびガイド核酸分子は、別々の構成成分として標的細胞／生物中に導入される。他の例では、精製されたＣａｓ１３ｄタンパク質は、ガイド核酸（例えば、ｇＲＮＡ）と複合体化され、このリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体は、標的細胞中に（例えば、トランスフェクションまたは注射を使用して）導入される。一部の例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質およびガイド分子は、胚（例えば、ヒト、マウス、ゼブラフィッシュまたはＸｅｎｏｐｕｓ胚）中に注射される。

【０１７０】

Ｃａｓ１３ｄタンパク質およびガイド核酸分子が細胞中にあると、１つまたは複数のＲＮＡが標的化され得る。

【０１７１】

２．核酸からのＣａｓ１３ｄの発現

一例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、標的ＲＮＡ、例えば、検出または改変されるＲＮＡを含有する細胞において、核酸分子から発現される。一部のかかる例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、細胞中または無細胞系中に導入されたベクター、例えば、ウイルスベクターまたはプラスミドから発現される。これは、細胞、生物または系におけるＣａｓ１３ｄタンパク質の産生を生じる。さらに、これらの核酸分子は、標的ＲＮＡに特異的なガイド核酸分子（例えば、ｇＲＮＡ）と共に、細胞／生物／系において共発現され得る。

【０１７２】

一例では、複数のプラスミドまたはベクターが、ＲＮＡ標的化に使用される。Ｃａｓ１３ｄをコードする核酸分子は、例えば、１つのベクターまたはプラスミド上で、ガイド核酸分子（例えば、ｇＲＮＡ）は、別のプラスミドまたはベクター上で提供され得る。複数のプラスミドまたはウイルスベクターは、混合され、細胞（または無細胞系）中に同時に、または別々に導入され得る。

【０１７３】

一部の例では、複数の核酸分子が、単一のベクターまたはプラスミドから発現される。例えば、単一のベクターが、Ｃａｓ１３ｄをコードする核酸分子を含み得、別のベクターが、ガイド分子を含み得る。

【０１７４】

一部の例では、各標的（例えば、１、２、３、４、５または１０個の異なる標的）について１つの、複数の異なるガイド分子（例えば、ｇＲＮＡ）が、単一のアレイおよび／またはベクター上に存在する。一例では、方法は、アレイ（これは、ベクター、例えば、ウイルスベクターまたはプラスミドの一部であり得る）の一部である複数のｇＲＮＡ（例えば、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２０または少なくとも５０個の異なるｇＲＮＡ）を送達するステップを含む。細胞または無細胞系中に導入されると、アレイは、Ｃａｓ１３ｄタンパク質によって、個々の成熟ｇＲＮＡへとプロセシングされる。

【０１７５】

ベクターから発現される核酸分子は、プロモーターの制御下にあり、必要に応じて、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性）を含有し得る。

【０１７６】

一部の例では、タンパク質およびガイド分子は、胚（例えば、ゼブラフィッシュまたは

Ｘｅｎｏｐｕｓ胚）によって発現される。Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、注射されたプラスミドＤＮＡ、注射されたｍＲＮＡ、または動物ゲノム中に安定に組み込まれたコピーから発現され得る。ｇＲＮＡは、直接注射されるか、またはベクター、もしくは動物ゲノム中に安定に組み込まれたコピーから発現され得る。

【０１７７】

３．標的

１つまたは複数のＲＮＡ、例えば、細胞、無細胞系または生物中の少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４または少なくとも５つの異なるＲＮＡ、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個の異なるＲＮＡが、開示された方法によって標的化され得る。一例では、ＲＮＡは、嚢胞性線維症、ハンチントン病、テイ・サックス病、脆弱Ｘ症候群、脆弱Ｘ関連振戦／失調症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症または家族性ＡＬＳなどの疾患と関連する。一例では、ＲＮＡは、がん（例えば、肺、乳房、結腸、肝臓、膵臓、前立腺、骨、脳、皮膚（例えば、黒色腫）または腎臓のがん）と関連する。標的ＲＮＡの例には、がんと関連するもの（例えば、ＢＣＲ－ＡＢＬ、Ｒａｓ、Ｒａｆ、ｐ５３、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＣＸＣＲ４、ベーターカテニン、ＨＥＲ２およびＣＤＫ４）が含まれるがこれらに限定されない。

【０１７８】

一例では、ＲＮＡは、ウイルス感染、例えば、プラス鎖ＲＮＡウイルス、例えば、ピコルナウイルス（例えば、アフトウイルス科［例えば、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）］）、カルジオウイルス科；エンテロウイルス科（例えば、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルスおよびポリオウイルス）；ライノウイルス科（ライノウイルス））；ヘパトウイルス科（Hepataviridae）（Ａ型肝炎ウイルス）；トガウイルス（その例には、風疹；アルファウイルス（例えば、西部ウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルスおよびベネズエラウマ脳炎ウイルス）が含まれる）；フラビウイルス（その例には、デングウイルス、ウエストナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスが含まれる）；カリシウイルス科（Calciviridae）（これには、ノロウイルスおよびサポウイルスが含まれる）；もしくはコロナウイルス（その例には、Ｕｒｂａｎｉ株などのＳＡＲＳコロナウイルスが含まれる）、またはマイナス鎖ＲＮＡウイルス、例えば、オルソミクソウイルス（Orthomyxyovirus）（例えば、インフルエンザウイルス）、ラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）およびパラミクソウイルス（その例には、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルスまたはパラインフルエンザウイルスが含まれる）による感染、あるいはＤＮＡウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス（例えば、水痘帯状疱疹ウイルス、例えばＯｋａ株；サイトメガロウイルス；ならびに単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）１型および２型）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス１型およびアデノウイルス４１型）、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）またはパルボウイルス（例えば、パルボウイルスＢ１９）による感染）と関連する。

【０１７９】

一例では、ＲＮＡは、細菌感染、または細菌感染の特性、例えば、耐菌性、持続性もしくは抗生物質耐性と関連する。これらのＲＮＡの検出は、診断的方法のために使用され得るが、細胞ベースの系または無細胞系におけるこれらのＲＮＡの編集は、治療的方法に使用され得る。

【０１８０】

４．ＲＮＡを検出する方法

一例では、ＲＮＡを標的にする方法は、標的ＲＮＡの検出、視覚化または標識化を生じる。例えば、突然変異したＨＥＰＮドメインを有する少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）、標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有する少なくとも１つのｇＲＮＡ、およびエフェクターモジュールを使用することによって、標的ＲＮＡは、Ｃａｓ１３ｄによって認識されるが、切断もニックを入れることもされず、一方でエフェクターモジュールは、活性化される。一部の例では、か

かる方法は、標的ＲＮＡを検出するために使用される。かかる方法は、標的ＲＮＡが例えば腫瘍細胞中に存在するかどうかを決定するために、細胞または無細胞系において使用され得る。一部の例では、細胞または無細胞系は、組織試料、血液試料または唾液試料から取得される。

【０１８１】

一例では、ＲＮＡを検出する方法は、標的ＲＮＡに特異的なスペーサー配列を含有するｇＲＮＡと共に、蛍光タンパク質または他の検出可能な標識に融合されたＣａｓ１３ｄタンパク質を含む。標的ＲＮＡへのＣａｓ１３ｄの結合は、顕微鏡法、またはイメージングの他の方法によって、視覚化され得る。別の例では、ＲＮＡアプタマー配列、例えば、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、および他のアプタマーは、ｇＲＮＡ分子に付け足されるか、またはその中に挿入され得る。Ｃａｓ１３ｄ－ｇＲＮＡ－標的ＲＮＡ複合体は、アプタマー相互作用を介して標識されるので、蛍光タンパク質または他の検出可能な標識に融合された、これらのアプタマーに特異的に結合するタンパク質、例えば、ＭＳ２ファージコートタンパク質の導入は、標的ＲＮＡを検出するために使用され得る。

【０１８２】

別の例では、ＲＮＡを検出する方法は、診断薬または治療薬のための転写センサー（例えば、合成回路の一部としての）である。例えば、転写センサーは、突然変異したＨＥＰＮドメインを有する少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）、標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有する少なくとも１つのｇＲＮＡ、およびエフェクターモジュール、例えば、必要に応じてスプリットされた蛍光タンパク質またはプローブ；必要に応じてスプリットされた発光タンパク質またはプローブ；検出可能な反応を触媒する、必要に応じてスプリットされた酵素、例えば、ユビキチンまたはＴＥＶプロテアーゼ；ＦＲＥＴ適合性のタンパク質対；切断可能なリンカーを介してＣａｓ１３ｄに融合された１つまたは複数の転写因子；転写因子などの機能を回復させるためにタンパク質をトランススプライシングするスプリットインテイン；リン酸化の際に活性化するキナーゼ－基質対；二量体化または多量体化の際に活性化する１つ、２つまたはそれよりも多くのモノマー；または相互作用の際にコンフォメーションおよび機能的変化を誘導する１つまたは複数のタンパク質から構成され得る。一例では、特定の転写物を結合することに起因する２つまたはそれよりも多くのＣａｓ１３ｄタンパク質およびｇＲＮＡの空間的近接は、エフェクターモジュールを活性化し、細胞において検出可能なシグナルまたは検出可能な活性を生じる。

【０１８３】

例えば、転写センサーは、がん特異的転写物、炎症特異的転写物、疾患特異的転写物または細胞状態特異的転写物が検出されるのを可能にし得る。特定の転写物を感知することができるＣａｓ１３ｄベースの系を含有する合成回路は、例えば、治療適用のために遺伝子を上方調節または下方調節するために標的検出を必要とする、条件付きロジック（conditional logic）をコードし得る。

【０１８４】

一例では、方法は、検出され得る標的ＲＮＡに結合している検出可能な薬剤を生じる。例えば、各々がフルオロフォア（例えば、ＧＦＰ）の一部を含む２つの別々のＣａｓ１３ｄ融合タンパク質、および密接に近接したＲＮＡの領域を標的にする異なるスペーサー配列を有する２つの異なるｇＲＮＡが、使用され得る。２つの部分が標的ＲＮＡに近接して結合する場合、フルオロフォアの２つの部分は、完全なフルオロフォアを形成し、それによって、検出可能なシグナルを生成する。

【０１８５】

一例では、方法は、例えば、応答を、例えば、第２の遺伝子の発現、タンパク質の改変、異なる位置へのタンパク質またはＲＮＡの転座、自殺遺伝子を介した細胞死の誘導、細胞増殖の誘導、二次機能を可能にする導入遺伝子の誘導、過去の転写事象の記憶を保存することを可能にするＤＮＡ配列における永続的変化の誘導を誘発すること、またはプルダウンを可能にするためにＲＮＡを変更することによって、ＲＮＡ検出を生じる。

【０１８６】
一実施形態では、転写因子の２つの半分は、スプリットインテイン系を介して、２つの別々のＣａｓ１３ｄに連結され得る。Ｃａｓ１３ｄタンパク質には、密接に近接したＲＮＡの領域を標的にする異なるスペーサー配列を有する２つの異なるｇＲＮＡが提供される。標的ＲＮＡに近接して結合すると、スプリットインテインは、再構成された転写因子（ＴＦ）をトランススプライシングして、それが核に転座し、標的遺伝子または標的遺伝子のクラスターのスイッチをオンにできるようにする。一例では、標的遺伝子は、細胞中の内因性遺伝子であり得る。別の例では、標的遺伝子は、ベクター上で発現される、または遺伝子操作を介して導入される導入遺伝子、例えば、蛍光タンパク質または毒素であり得る。
【０１８７】
５．無細胞系においてＲＮＡを検出する方法
一例では、無細胞系において標的ＲＮＡを検出する方法は、検出可能な標識または酵素活性を生じる。例えば、少なくとも１つのＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号３、４２、６２、７０、８２、８３および９２）、標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有する少なくとも１つのｇＲＮＡ、および検出可能な標識を使用することによって、標的ＲＮＡは、Ｃａｓ１３ｄによって認識される。Ｃａｓ１３ｄによる標的ＲＮＡの結合は、そのＲＮａｓｅ活性を誘発し、これが、標的ＲＮＡの切断ならびに検出可能な標識をもたらし得る。
【０１８８】
一例では、検出可能な標識は、蛍光プローブおよびクエンチャーに連結されたＲＮＡである。インタクトな検出可能なＲＮＡは、蛍光プローブおよびクエンチャーを連結して、蛍光を抑制する。Ｃａｓ１３ｄによる検出可能なＲＮＡの切断の際に、蛍光プローブは、クエンチャーから放出され、蛍光活性を示す。かかる方法は、標的ＲＮＡが、溶解された細胞試料、溶解された組織試料、血液試料、唾液試料、環境試料（例えば、水、土壌または空気試料）、または他の溶解された細胞もしくは無細胞試料中に存在するかどうかを決定するために使用され得る。かかる方法は、病原体、例えば、ウイルスまたは細菌を検出する、またはがんなどの疾患状態を診断するためにも使用され得る。
【０１８９】
一例では、標的ＲＮＡの検出は、疾患および／もしくは病理学的状態、またはウイルスもしくは細菌感染の存在の診断を補助する。例えば、非コーディングＲＮＡ、例えばＰＣＡ３の、Ｃａｓ１３ｄ媒介性の検出は、患者尿中で検出された場合、前立腺がんを診断するために使用され得る。別の例では、胃がんのバイオマーカーであるｌｎｃＲＮＡ－ＡＡ１７４０８４のＣａｓ１３ｄ媒介性の検出は、胃がんを診断するために使用され得る。
【０１９０】
６．標的ＲＮＡを編集する方法
一例では、ＲＮＡを標的にする方法は、標的ＲＮＡの配列の編集を生じる。例えば、突然変異していないＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、３、４２、６２、７０、８２、８３または９２）、および標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するｇＲＮＡを使用することによって、標的ＲＮＡは、正確な位置において切断またはニックを入れられ得る。一部の例では、かかる方法は、標的ＲＮＡの発現を減少させるために使用され、これが、対応するタンパク質の翻訳を減少させる。かかる方法は、ＲＮＡの増加した発現が所望されない細胞において使用され得る。一例では、ＲＮＡは、嚢胞性線維症、ハンチントン病、テイ・サックス病、脆弱Ｘ症候群、脆弱Ｘ関連振戦／失調症候群、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症または家族性ＡＬＳなどの疾患と関連する。別の例では、ＲＮＡは、がん（例えば、肺、乳房、結腸、肝臓、膵臓、前立腺、骨、脳、皮膚（例えば、黒色腫）または腎臓のがん）と関連する。標的ＲＮＡの例には、がんと関連するもの（例えば、ＰＤ－Ｌ１、ＢＣＲ－ＡＢＬ、Ｒａｓ、Ｒａｆ、ｐ５３、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＣＸＣＲ４、ベーターカテニン、ＨＥＲ２およびＣＤＫ４）が含まれるがこれらに限定

されない。かかる標的ＲＮＡを編集することは、治療効果を有し得る。
【０１９１】
別の例では、ＲＮＡは、免疫細胞において発現される。標的ＲＮＡは、例えば、望ましい免疫応答の抑制、例えば、腫瘍の浸潤をもたらすタンパク質をコードし得る。かかるＲＮＡのノックダウンは、かかる望ましい免疫応答の進行を可能にし得る（例えば、ＰＤ１、ＣＴＬＡ４、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３）。別の例では、標的ＲＮＡは、例えば、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、クローン病、ループスまたは関節リウマチの状況において、免疫応答の望ましくない活性化を生じるタンパク質をコードする。
【０１９２】
一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、ＲＮＡによってコードされる標的タンパク質の発現を減少させることを可能にする。例えば、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄ融合タンパク質（例えば、配列番号２または４）および翻訳抑制ドメイン（例えば、ＰｕｍｉｌｉｏまたはＦＢＦ　ＰＵＦタンパク質、デアデニラーゼ（deadenylase）、ＣＡＦ１、アルゴノートタンパク質およびその他）、ならびに標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡを使用することによって、標的ＲＮＡの発現が減少され得る。
【０１９３】
一部の例では、Ｃａｓ１３ｄは、リボヌクレアーゼ（例えば、ＰＩＮエンドヌクレアーゼドメイン、ＮＹＮドメイン、ＳＯＴ１由来のＳＭＲドメイン、またはブドウ球菌ヌクレアーゼ由来のＲＮａｓｅドメイン）、またはＲＮＡ安定性に影響を与えるドメイン（例えば、トリステトラプロリン、またはＵＰＦ１、ＥＸＯＳＣ５およびＳＴＡＵ１由来のドメイン）に融合され得る。
【０１９４】
別の例では、ＲＮＡアプタマー配列、例えば、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、および他のアプタマーは、ｇＲＮＡ分子に付け足されか、またはその中に挿入され得る。これらのアプタマーに特異的に結合するタンパク質、例えば、ＭＳ２ファージコートタンパク質は、翻訳抑制ドメイン、リボヌクレアーゼ、またはＲＮＡ安定性に影響を与えるドメインに融合され得る。Ｃａｓ１３ｄおよびｇＲＮＡ複合体は、アプタマータンパク質－エフェクタードメインを標的ＲＮＡに近接するようにガイドするので、このアプタマー－エフェクタードメイン融合物は、標的ＲＮＡを標的にするために使用され得る。
【０１９５】
かかる方法は、ＲＮＡの増加した発現が所望されない細胞において、例えば、発現されたＲＮＡが、嚢胞性線維症、ハンチントン病、テイ・サックス病、脆弱Ｘ症候群、脆弱Ｘ関連振戦／失調症候群、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症または家族性ＡＬＳなどの疾患と関連する場合に、使用され得る。別の例では、標的ＲＮＡは、がん（例えば、肺、乳房、結腸、肝臓、膵臓、前立腺、骨、脳、皮膚（例えば、黒色腫）または腎臓のがん）と関連する。標的ＲＮＡの例には、がんと関連するもの（例えば、ＰＤ－Ｌ１、ＢＣＲ－ＡＢＬ、Ｒａｓ、Ｒａｆ、ｐ５３、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＣＸＣＲ４、ベーターカテニン、ＨＥＲ２およびＣＤＫ４）が含まれるがこれらに限定されない。かかる標的ＲＮＡを編集することは、治療効果を有する。
【０１９６】
別の例では、ＲＮＡは、免疫細胞において発現される。標的ＲＮＡは、例えば、望ましい免疫応答の抑制、例えば、腫瘍の浸潤をもたらすタンパク質をコードし得る。かかるＲＮＡのノックダウンは、かかる望ましい免疫応答の進行を可能にし得る（例えば、ＰＤ１、ＣＴＬＡ４、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３）。別の例では、標的ＲＮＡは、例えば、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、クローン病、ループスまたは関節リウマチの状況において、免疫応答の望ましくない活性化を生じるタンパク質をコードし得る。
【０１９７】
一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡの発現を活性化または増加させることを可能にする。例えば、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄ融合

タンパク質（例えば、配列番号２または４）および翻訳活性化ドメイン（例えば、ｅＩＦ４Ｅおよび他の翻訳開始因子、酵母ポリ（Ａ）結合性タンパク質またはＧＬＤ２のドメイン）、ならびに標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡを使用することによって、標的ＲＮＡの発現が増加され得る。翻訳活性化ドメインに融合された同族アプタマー結合性タンパク質を用いたｇＲＮＡ中へのアプタマー導入もまた使用され得る。一例では、ＲＮＡアプタマー配列、例えば、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、および他のアプタマーは、ｇＲＮＡ分子に付け足されるか、またはその中に挿入される。Ｃａｓ１３ｄおよびｇＲＮＡ複合体は、アプタマータンパク質－翻訳活性化ドメインを標的ＲＮＡに近接させるので、翻訳活性化ドメインに融合された、これらのアプタマーに特異的に結合するタンパク質、例えば、ＭＳ２ファージコートタンパク質の導入は、標的ＲＮＡを標的にするために使用され得る。

【０１９８】

一部の例では、かかる方法は、標的ＲＮＡの活性または発現を増加させるために使用され、これが、対応するタンパク質の翻訳を増加させる（ＲＮＡがコーディングＲＮＡである場合）。かかる方法は、ＲＮＡの増加した発現が所望される細胞、例えば、コピー数変異によって引き起こされるヘテロ接合性遺伝性疾患または障害において使用され得る。所望のタンパク質産物の翻訳を増加させることは、事実上治療的であり得る。

【０１９９】

別の例では、標的ＲＮＡ（例えば、サイクリンＢ１）の発現を増加させることは、標的細胞（例えば、がん）を、薬物（例えば、化学療法剤）に対してより感受性にし得る。

【０２００】

一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡにおける、１つまたは複数のＲＮＡ塩基置換、ＲＮＡ塩基編集、ＲＮＡ塩基欠失、ＲＮＡ塩基挿入、またはそれらの組合せを可能にする。一部の例では、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質は、直接的融合またはｇＲＮＡ－アプタマー改変のいずれかを介して、塩基編集を可能にするエフェクタードメイン（例えば、シチジンデアミナーゼ、ＰＰＲタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、ＡＤＡＲファミリータンパク質またはＡＰＯＢＥＣファミリータンパク質）と関連する。一部の例では、かかる方法は、ＲＮＡ配列を改変するため、ＲＮＡ突然変異を編集する、またはＲＮＡ転写物を改変するため（例えば、遺伝子治療）、例えば、疾患、例えば、ＡＬＳおよび黒色腫、または不要なスプライス部位によって引き起こされる遺伝性障害、例えばレーバー先天黒内障を処置するために、使用される。

【０２０１】

一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡのメチル化を可能にする。一部の例は、直接的融合またはｇＲＮＡ－アプタマー改変のいずれかを介して、メチル化ドメイン（例えば、ｍ６Ａ）、および標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡと関連した、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するキメラＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）を使用し得る。一部の例では、かかる方法は、異常なＲＮＡ脱メチル化と戦うために使用される。一例では、かかる方法は、例えば、乳がん細胞中でのそれらの安定性を減少させるために、多能性転写物、例えば、ＮＡＮＯＧまたはＫＬＦ４のメチル化レベルを改変するために使用され、これが、増加した増殖およびがん幹細胞形成と関連する乳がん幹細胞表現型の獲得を抑制し得る。

【０２０２】

一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡの脱メチル化を可能にする。一部の例は、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）、標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡ、および脱メチル化ドメイン（例えば、ヒトアルキル化修復ホモログ５、すなわちＡｌｋｂｈ５）を使用することができる。脱メチル化ドメインは、Ｃａｓ１３ｄタンパク質への直接的融合、またはｇＲＮＡ－アプタマー改変のいずれかを介して、関連し得る。一部の例では、かかる方法は、m^6Aレベルを減少させることによって、例えば、骨髄性白血病を処置するために、異常なＲＮＡメチル化を逆転させるために使用される。

【０２０３】
一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡへの結合を可能にする。例えば、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）および標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡを使用することによって、分子は、標的ＲＮＡに結合または係留され得る。一部の例では、かかる方法は、標的ＲＮＡを捕捉するため（例えば、免疫沈降）に使用される。これは、特異的ＲＮＡ転写物と相互作用するタンパク質を識別するために、キットの一部として使用され得る。一例では、エピトープタグ化Ｃａｓ１３ｄ（例えば、ＦＬＡＧ、ＨＡ、ビオチン、ＨＡＬＯタグ）は、特異的標的ＲＮＡに標的化され、固定化（例えば、パラホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒドを用いる）を介して架橋され得る。エピトープ認識抗体によるＣａｓ１３ｄの免疫沈降は、ウエスタンブロットまたは質量分析を介した、共免疫沈降されたタンパク質の識別を可能にする。
【０２０４】
別の例では、Ｃａｓ１３ｄは、標的ＲＮＡと相互作用するタンパク質をビオチン化するために、ビオチンリガーゼ（例えば、ＢｉｒＡ）またはペルオキシダーゼ（例えば、ＡＰＥＸ２）に融合され得る。次いで、標識されたタンパク質は、ストレプトアビジンビーズによってプルダウンされ、その後質量分析またはウエスタンブロットされ得る。
【０２０５】
一部の例では、ビオチン化されたＣａｓ１３ｄは、ｇＲＮＡを用いてリボソームＲＮＡ配列に標的化され得る。ストレプトアビジンビーズ媒介性プルダウンは、ＲＮＡシーケンシングライブラリー調製のためにｒＲＮＡを枯渇させるために使用され得る。
【０２０６】
一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡのマスクを可能にする。例えば、突然変異したまたはインタクトなＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質、および標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡを使用することによって、標的ＲＮＡは、ＲＮＡ結合性タンパク質またはＲＮＡ結合性エレメント、例えばｍｉＲＮＡからマスクされ得る。
【０２０７】
一部の例では、Ｃａｓ１３ｄは、ＲＮＡ結合性部位をＲＮＡ結合性タンパク質（ＲＢＰ）からマスクするために使用され得る。別の例では、Ｃａｓ１３ｄは、ｍｉＲＮＡ結合性部位をマスクすることができる。例えば、肝臓特異的ｍｉＲ－１２２は、Ｃ型肝炎ウイルスＲＮＡと共に、分解からそれを保護する複合体を形成する。ＨＥＰＮ活性なＣａｓ１３ｄタンパク質は、ｍｉＲＮＡ－１２２媒介性保護を逆転させるのと同時にＨＣＶ　ＲＮＡを直接分解することによって、ＨＣＶ感染と相乗的に戦うために、ウイルスＲＮＡ上のｍｉＲＮＡ－１２２結合性部位に標的化され得る。一部の例では、かかる方法は、例えば、標的ＲＮＡを分解から保護するために、標的ＲＮＡ分子を保存または保護するために使用される。例えば、標的遺伝子の３’ＵＴＲ中のＡＵ－リッチエレメントを標的にすることによって、ＨＥＰＮ突然変異したＣａｓ１３ｄは、標的転写物の分解をもたらすＲＮＡ結合性タンパク質、例えば、トリステトラプロリン（ＴＴＲ）またはＡＵＦ１の結合を遮断することができる。
【０２０８】
一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡのスプライシングを変化させることを可能にする。スプライスアクセプターおよび／またはドナー部位ならびにスプライスエフェクタードメインの直接的結合は共に、スプライシングを操作するために使用され得る。例えば、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）、標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡ、および必要に応じて、スプライシングに影響を与えるエフェクタードメイン（例えば、ＳＲＳＦ１のＲＳ－リッチドメイン、ｈｎＲＮＰ　Ａ１のＧｌｙ－リッチドメイン、ＲＢＭ４のアラニン－リッチモチーフ、またはＤＡＺＡＰ１のプロリン－リッチモチーフ）を使用することによって、ＲＮＡの選択的スプライシングが達成され得る

。

【０２０９】

一部の例では、かかる方法は、エクソン包含のため、例えば、ポンペ病を処置するために酸性アルファ－グルコシダーゼ（ＧＡＡ）のエクソン２を含むために、または脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）を処置するためにＳＭＮ２のエクソン７を含むために使用される。一部の例では、かかる方法は、エクソン排除のため、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを処置するためにジストロフィンのリーディングフレームを回復させるため、またはがんを処置するために抗アポトーシス性の長いアイソフォームからアポトーシス促進性の短いアイソフォームへとＢｃｌ－ｘプレｍＲＮＡのスプライシングをシフトさせるために使用される。

【０２１０】

一部の例では、方法は、スプライスアクセプターまたはドナー部位をマスクするため、例えば、コールドの腫瘍をホットにするためのネオ抗原を創出するために、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質を使用する。ある特定の標的プレｍＲＮＡのスプライシングに影響を与えることによって、この方法は、がん細胞におけるネオエピトープの創出をもたらし得る新規エクソン－エクソン接合部を生成することができる。これは、非天然抗原のディスプレイに起因して、がん細胞を、免疫系に対して脆弱なものにすることができる。他の例では、この方法は、アイソフォーム比を動的に操作するため、またはタンパク質（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーについてはジストロフィン）のリーディングフレームを回復させるために使用され得る。

【０２１１】

一例では、標的ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡの転写物輸送の制御を可能にする。例えば、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄ融合タンパク質（例えば、配列番号２または４）および細胞内局在化シグナルまたはエクスポート配列、標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡを使用することによって。一部の例では、かかる方法は、標的ＲＮＡ分子を特定のオルガネラまたは細胞質ゾル区画に輸送するために、またはさらには、標的ＲＮＡ転写物を、例えば、細胞外放出のためにエンドソームにエクスポートするために使用される。

【０２１２】

別の例では、方法は、ＲＮＡ輸送に影響を与え得る。例えば、ジップコード結合性タンパク質ＺＢＰ１は、線維芽細胞の前縁へのある特定の転写物の局在化をもたらすＲＮＡ配列５’－ＣＧＧＡＣ（Ｃ／Ａ－ＣＡ－Ｃ／Ｕ）を特異的に認識する。特定のＲＮＡジップコードまたは調節配列を、調節タンパク質複合体による認識からマスクまたは操作することによって、この方法は、細胞内でのＲＮＡ局在化または輸送に影響を与え得る。

【０２１３】

一例では、標的ＲＮＡは、核局在化したＲＮＡである。例えば、核局在化シグナルに融合された、突然変異していないＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、３、４２、６２、７０、８２、８３および９２）、および標的核ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡを使用することによって、核局在化したＲＮＡは、標的化または分解され得る。一部の例では、かかる方法は、標的核ＲＮＡ分子を分解するため、例えば、非コーディング核ＲＮＡ、例えば、乳がんにおける転移性の進行と関連するＨＯＴＡＩＲをノックダウンするために使用される。

【０２１４】

一例では、標的ＲＮＡは、ウイルスＲＮＡ、またはＤＮＡウイルスの転写物である。例えば、突然変異していないＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号１、３、４２、６２、７０、８２、８３および９２）および標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡが使用され得る。一部の例では、かかる方法は、例えば、ウイルスＲＮＡ、またはＤＮＡウイルスの転写物を切断することによって、ＲＮＡウイルス感染、例えば、プラス鎖ＲＮＡウイルス、例えば、ピコルナウイルス（例えば、アフトウイルス科［例えば、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）］）、カ

ルジオウイルス科；エンテロウイルス科（例えば、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルスおよびポリオウイルス）；ライノウイルス科（ライノウイルス））；ヘパトウイルス科（Ａ型肝炎ウイルス）；トガウイルス（その例には、風疹；アルファウイルス（例えば、西部ウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルスおよびベネズエラウマ脳炎ウイルス）が含まれる）；フラビウイルス（その例には、デングウイルス、ウエストナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスが含まれる）；カリシウイルス科（これには、ノロウイルスおよびサポウイルスが含まれる）；もしくはコロナウイルス（その例には、Ｕｒｂａｎｉ株などのＳＡＲＳコロナウイルスが含まれる）、またはマイナス鎖ＲＮＡウイルス、例えば、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、ラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）およびパラミクソウイルス（その例には、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルスまたはパラインフルエンザウイルスが含まれる）による感染、あるいはＤＮＡウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス（例えば、水痘帯状疱疹ウイルス、例えばＯｋａ株；サイトメガロウイルス；ならびに単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）１型および２型）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス１型およびアデノウイルス４１型）、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）またはパルボウイルス（例えば、パルボウイルスＢ１９）による感染）を処置するために使用される。したがって、かかる方法は、ＲＮＡベースの抗ウイルス薬または抗菌薬として使用され得る。

【実施例】

【０２１５】

（実施例１）

材料および方法

この実施例は、実施例２～７に示される結果を得るために使用した材料および方法を記載する。

【０２１６】

ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）細胞系２９３ＦＴの細胞培養

ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）細胞系２９３ＦＴ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を、１０％ＦＢＳ（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）および１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを補充したＤＭＥＭ（４．５ｇ／Ｌグルコース）中で、３７℃で５％CO_2で維持した。８０～９０％コンフルエンシーに達したところで、細胞を、ＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して解離させ、１：２の比で継代した。

【０２１７】

ヒト骨肉腫上皮細胞系Ｕ２ＯＳの細胞培養

ヒト骨肉腫上皮Ｕ２ＯＳを、１０％ＦＢＳおよび１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを補充したＤＭＥＭ（４．５ｇ／Ｌグルコース）中で、３７℃で５％CO_2で維持した。７０％コンフルエンスに達したところで、細胞を１：３の比で継代した。この細胞系は、認証しなかった。

【０２１８】

誘導多能性幹細胞の維持およびニューロン分化

ＦＴＤＰ－１７　ＩＶＳ１０＋１６突然変異を含有する安定なヒトｉＰＳＣ系統または年齢および性別がマッチした対照系統を、Ｆｅｎ－Ｂｉａｏ　Ｇａｏの実験室から取得した（Biswas et al., 2016）。簡潔に述べると、ＭＡＰＴ　ＩＶＳ１０＋１６突然変異を有する１人の男性患者から取得した細胞および１人の男性対照患者由来の２つの別々の系統を、ｈｉＰＳＣへとリプログラムした（Almeida et al., 2012）。ｉＰＳＣに、ドキシサイクリン誘導性Ｎｇｎ２カセットを含有するレンチウイルスを形質導入した。レンチウイルスプラスミドは、S.SchaferおよびF.Gageからの贈与であった。次いで、ｉＰＳＣを、Ａｃｃｕｔａｓｅを用いて継代し、ＲＯＣＫ阻害剤Ｙ－２７６３２（１０μＭ、Ｃａｙｍａｎ）を含有するｍＴＥＳＲ培地を有するＭａｔｒｉｇｅｌコーティングされた６ウェルプレート中に、１ウェル当たり５００，０００細胞でプレートした。１日目に、培地をｍＴＥＳＲに交換した。２日目に、培地を、ドキシサイクリン（２μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）を含有するｍＴＥＳＲに交換して、Ｎｇｎ２発現を誘導した。３日目に、培養

培地を、神経誘導培地（ＮＩＭ、ＢＳＡ（０．１ｍｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）、アポートランスフェリン（０．１ｍｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）、プトレシン（１６μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）、プロゲステロン（０．０６２５μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）、亜セレン酸ナトリウム（０．０１０４μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）、インスリン（５μｇ／ｍｌ、Ｒｏｃｈｅ）、ＢＤＮＦ（１０ｎｇ／ｍｌ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、ＳＢ４３１５４２（１０μＭ、Ｃａｙｍａｎ）、ＬＤＮ－１９３１８９（０．１μＭ、Ｓｉｇｍａ）、ラミニン（２μｇ／ｍｌ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ドキシサイクリン（２μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）およびピューロマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含有するＤＭＥＭ／Ｆ１２（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））で置き換えた。ＮＩＭ培地を毎日交換した。３日間のピューロマイシン選択後、未熟なニューロン細胞を、Ａｃｃｕｍａｘ（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて継代し、ポリ－Ｄ－リシンおよびＭａｔｒｉｇｅｌでコーティングされた９６ウェルプレート上に、神経成熟化培地（ＮＭＭ；Ｂ２７（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＢＤＮＦ（１０ｎｇ／ｍｌ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、Ｎ－アセチルシステイン（Ｓｉｇｍａ）、ラミニン（２μｇ／ｍｌ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ｄｂｃＡＭＰ（４９μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）およびドキシサイクリン（２μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）を含有する１：１　Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ／ＤＭＥＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））中でプレートした。培地を、次の日（７日目）に、ＡｒａＣ（２μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）を含有するＮＭＭで置き換えて、いずれの残りの非分化細胞をも排除した。８日目に、ＡｒａＣを除去し、アストロサイトを、ニューロンの上にプレートして、ｈｂＥＧＦ（５ｎｇ／ｍｌ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を含有するＮＭＭ中でのニューロン培養物を支持した。細胞に、１０日目にＡＡＶを形質導入し、２４日目にアッセイした。

【０２１９】

Ｃａｓ１３ｄ識別のための計算的パイプライン

本発明者らは、２０１６年６月にＮＣＢＩ　Ｇｅｎｏｍｅから全ゲノム、染色体およびスキャフォールドレベルの原核生物ゲノムアセンブリを取得し、ＣＲＩＳＰＲリピートを識別するために、ＣＲＩＳＰＲｆｉｎｄｅｒ、ＰＩＬＥＲ－ＣＲおよびＣＲＴを比較した。各推定ＣＲＩＳＰＲリピート周囲の２０キロベースの隣接領域を抽出して、Ｐｙｔｈｏｎを使用して、近隣タンパク質および予測されたタンパク質を識別した。候補Ｃａｓタンパク質は、＞７５０ａａ長かつリピートアレイの５タンパク質以内である必要があり、抽出されたＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、Ｉ～ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲなどの公知のＣＲＩＳＰＲ系と関連するＣａｓ遺伝子をそれらが含有した場合、濾別した。推定エフェクターを、全て対全て（all-by-all）のＢＬＡＳＴｐ分析とその後の単リンク（single-linkage）階層的クラスタリングとを介して、ファミリーへとクラスター化し、このとき、少なくとも６０のビットスコアが、クラスター割当てに必要であった。少なくとも２つのタンパク質の各クラスターを、類似性を割り当てるためにビットスコア＞２００を要求する、ＮＣＢＩ非冗長（ｎｒ）タンパク質データベースに対するＢＬＡＳＴ検索に供した。ＣＲＩＳＰＲアレイに対する各拡張されたクラスター中の相同なタンパク質の同時出現を分析したところ、＞７０％であることが必要であった。タンパク質ファミリーを、平均アミノ酸長によって選別し、各クラスターについての複数の配列アライメントを、Ｂｌｏｓｕｍ６２　ｃｏｓｔマトリックスと共にＣｌｕｓｔａｌ　ＯｍｅｇａおよびＧｅｎｅｉｏｕｓアライナーを使用して実施した。ＲｘｘｘｘＨ　ＨＥＰＮモチーフが、このアライメントに基づいて、Ｃａｓ１３ｄファミリーにおいて識別された。ＴＢＬＡＳＴＮを、予測されたオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）なしの公的メタゲノム全ゲノムショットガン配列に対する全ての予測されたＣａｓ１３ｄエフェクターに対して実施した。Ｃａｓ１３ｄファミリーを、ゲノムおよびメタゲノムデータベースに対する毎月のＢＬＡＳＴ検索を介して定期的にアップデートして、任意の新たに寄託された配列を識別した。新たな全長ホモログおよび相同な断片を、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｏｍｅｇａを使用してアラインし、ＰｈｙＭＬ３．２を使用してクラスター化した。ＣＲＩＳＰＲＤｅｔｅｃｔを使用して、Ｃａｓ１３ｄアレイ中のダイレクトリピートの方向を予測し、ＤＲフォールディング予測を、３７℃

でＡｎｄｒｏｎｅｓｃｕ ２００７ ＲＮＡエネルギーモデルを使用して実施した。Ｃａｓ１３ｄダイレクトリピートについての配列ロゴは、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ １０を使用して生成した。

【０２２０】

タンパク質発現および精製

組換えＣａｓ１３ｄタンパク質を、培養された単離体のゲノムＤＮＡ抽出またはメタゲノム試料からＰＣＲ増幅し、Ｎ末端Ｈｉｓ－ＭＢＰ融合物およびＴＥＶプロテアーゼ切断部位を有するｐＥＴベースのベクター中にクローニングした。得られたプラスミドを、Ｒｏｓｅｔｔａ２（ＤＥ３）細胞（Ｎｏｖａｇｅｎ）中に形質転換し、OD_{600}０．５において２００μＭ ＩＰＴＧで誘導し、１８℃で２０時間成長させた。次いで、細胞をペレット化し、凍結－解凍し、１×プロテアーゼ阻害剤錠剤、１ｍｇ／ｍＬリゾチーム、２．５Ｕ／ｍＬ Ｔｕｒｂｏ ＤＮａｓｅ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）および２．５Ｕ／ｍＬ塩活性ヌクレアーゼ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を補充した溶解緩衝液（５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、５００ｍＭ ＮａＣｌ、２ｍＭ ＭｇＣｌ２、２０ｍＭイミダゾール、１％ｖ／ｖ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、１ｍＭ ＤＴＴ）中に再懸濁した。次いで、溶解された試料を超音波処理し、遠心分離（４℃で１８，０００×ｇで１時間）を介して清澄化し、０．４５μＭ ＰＶＤＦフィルターで濾過し、元の細菌培養物１０Ｌ当たり５０ｍＬのＮｉ－ＮＴＡ Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ樹脂（Ｑｉａｇｅｎ）と共に１時間インキュベートした。ビーズ－溶解物混合物を、クロマトグラフィーカラムにアプライし、５カラム体積の溶解緩衝液および３カラム体積の溶出緩衝液（５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、５００ｍＭ ＮａＣｌ、３００ｍＭイミダゾール、０．０１％ｖ／ｖ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、１０％グリセロール、１ｍＭ ＤＴＴ）で洗浄した。次いで、試料を、カチオン交換（ＨｉＴｒａｐ ＳＰ、ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）およびゲル濾過（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １６／６００、ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）の前に、ＴＥＶ切断緩衝液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２５０ｍＭ ＫＣｌ、７．５％ｖ／ｖグリセロール、０．２ｍＭ ＴＣＥＰ、０．８ｍＭ ＤＴＴ、ＴＥＶプロテアーゼ）中に一晩透析した。精製され溶出されたタンパク質画分をプールし、タンパク質貯蔵緩衝液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１Ｍ ＮａＣｌ、１０％グリセロール、２ｍＭ ＤＴＴ）中４ｍｇ／ｍＬで凍結させた。

【０２２１】

ガイドおよび標的ＲＮＡの調製

Ｔ７プロモーターおよび適切な下流配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し（ＩＤＴ）、ｃｒＲＮＡについてはアンチセンスＴ７オリゴとアニーリングさせ、標的およびアレイ鋳型についてはＰＣＲ増幅した。ホモポリマー標的ＲＮＡを、Ｓｙｎｔｈｅｇｏによって合成した。オリゴアニールおよびＰＣＲ鋳型を、Ｈｉｓｃｒｉｂｅ Ｔ７ Ｈｉｇｈ Ｙｉｅｌｄ ＲＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓキット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて３１℃で１２時間ｉｎ ｖｉｔｒｏで転写した。標識された標的について、蛍光標識されたアミノアリル－ＵＴＰ ａｔｔｏ ６８０（Ｊｅｎａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を、２ｍＭでさらに添加した。ガイドＲＮＡを、ＲＮＡ－ｇｒａｄｅ Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ ＡＭＰｕｒｅ ＸＰビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて精製し、アレイおよび標的を、ＭＥＧＡｃｌｅａｒ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｃｌｅａｎ－Ｕｐ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて精製し、－８０℃で凍結した。ｓｓＤＮＡおよびｄｓＤＮＡ標的について、対応するオリゴヌクレオチド配列を合成し（ＩＤＴ）、ゲル精製またはＰＣＲ増幅し、次いで、それぞれ引き続いてゲル精製した。

【０２２２】

生化学的切断反応

精製されたＥｓＣａｓ１３ｄタンパク質およびガイドＲＮＡを、ＲＮＡ切断緩衝液（２５ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．５、１５ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ７．０、１ｍＭ ＤＴＴ、６ｍＭ ＭｇＣｌ２）中に２：１のモル比で混合した（特記しない限り）。反応物を、氷上

で調製し、３７℃で１５分間インキュベートし、その後、ＥｓＣａｓ１３ｄに対して１：２のモル比で標的を添加した。引き続いて、反応物を、３７℃で４５分間インキュベートし、１μＬの酵素停止溶液（１０ｍｇ／ｍＬプロテイナーゼＫ、４Ｍ尿素、８０ｍＭ ＥＤＴＡ、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０）で３７℃で１５分間クエンチした。次いで、反応物を、２×ＲＮＡローディング緩衝液（２×：１３ｍＭ Ｆｉｃｏｌｌ、８Ｍ尿素、２５ｍＭ ＥＤＴＡ）で８５℃で１０分間変性させ、１０％ＴＢＥ－尿素ゲル（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）上で分離した。標識された標的を含有するゲルを、Ｏｄｙｓｓｅｙ Ｉｍａｇｅｒ（Ｌｉ－Ｃｏｒ）で視覚化した；未標識のアレイまたは標的切断ゲルを、ＳＹＢＲ Ｇｏｌｄで染色し、その後、Ｇｅｌ Ｄｏｃ ＥＺシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を介してイメージングした。

【０２２３】

ヒト細胞系の一過的トランスフェクション

操作されたＣａｓ１３コード配列を、ＥＦ１ａプロモーターを含有する規格化されたプラスミド発現骨格中にクローニングし、製造業者のプロトコールに従ってＮｕｃｌｅｏｂｏｎｄ Ｘｔｒａ Ｍｉｄｉ ＥＦ Ｋｉｔ（Ｍａｃｈｅｒｙ Ｎａｇｅｌ）を使用して調製した。ＮＬＳ－ＬｗａＣａｓ１３ａ－ｍｓｆＧＦＰおよびＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＮＥＳ－ＨＩＶを、それぞれ、Feng Zhangからの贈与であるＡｄｄｇｅｎｅ ＃１０３８５４および＃１０３８６２からＰＣＲ増幅した。Ｃａｓ１３ｄプレｇＲＮＡおよびｇＲＮＡを、Ｕ６プロモーターを含有する最小の骨格中にクローニングした。ＬｗａＣａｓ１３ａについてのｓｈＲＮＡおよびガイドを、同じ骨格中にクローニングし、標的配列の３’においてそれらの対応するガイドＲＮＡに位置をマッチさせた。ＰｓｐＣａｓ１３ｂについてのマッチしたｇＲＮＡを、最も近い５’－Ｇヌクレオチドに移動させた。

【０２２４】

一過的トランスフェクションのために、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を、９６ウェルプレート中に１ウェル当たり２０，０００細胞の密度でプレートし、製造業者のプロトコールに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、＞９０％コンフルエンスにおいて、２００ｎｇのＣａｓ１３発現プラスミドおよび２００ｎｇのｇＲＮＡ発現プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、フローサイトメトリー、遺伝子発現分析または他の下流のプロセシングのために、トランスフェクションの４８～７２時間後に収集した。

【０２２５】

レポーターアッセイのために、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、１９２ｎｇのＣａｓ１３ｄ発現プラスミド、１９２ｎｇのガイド発現プラスミドおよび１２ｎｇのｍＣｈｅｒｒｙ発現プラスミドを、９６ウェルフォーマットでトランスフェクトした。細胞を、４８時間後に収集し、フローサイトメトリーによって分析した。

【０２２６】

Ｕ２ＯＳ細胞を、９６ウェルプレート中に１ウェル当たり２０，０００細胞の密度でプレートし、製造業者のプロトコールに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、＞９０％コンフルエンスにおいて、１００ｎｇのＣａｓ１３ｄ発現プラスミドをトランスフェクトし、４８時間後に免疫細胞化学のためにプロセシングした。

【０２２７】

フローサイトメトリー

細胞を、トランスフェクションの４８時間後にＴｒｙｐＬＥ Ｅｘｐｒｅｓｓを用いて解離させ、ＦＡＣＳ緩衝液（１×ＤＰＢＳ$^{-/-}$、０．２％ＢＳＡ、２ｍＭ ＥＤＴＡ）中に再懸濁した。フローサイトメトリーを、ＭＡＣＳＱｕａｎｔ ＶＹＢ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して９６ウェルプレートフォーマットで実施し、ＦｌｏｗＪｏ １０を使用して分析した。ＲＧ６は、Thomas Cooperからの贈与であり（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド＃８０１６７）、ＥＧＦＰをｍＴａｇＢＦＰ２で置き換えるように改変し

た。示された全ての試料を、３つの生物学的複製でアッセイした。ｍＣｈｅｒｒｙレポーターアッセイでは、データは、１つの条件当たり少なくとも２０，０００個のゲートされた事象を示す。スプライシングレポーターアッセイでは、データは、１つの条件当たり少なくとも２，５００個のゲートされた事象を示す。

【０２２８】

遺伝子発現分析

細胞を、トランスフェクションの４８時間後に、ＤＴＴを補充したＲＬＴ緩衝液で溶解させ、総ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｐｌｕｓカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して抽出した。次いで、２００ｎｇの総ＲＮＡを、ランダムヘキサマープライマーおよびＲｅｖｅｒｔａｉｄ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して、２５℃で１０分間、３７℃で６０分間および９５℃で５分間逆転写し、その後、２×Ｔａｑｍａｎ Ｆａｓｔ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）ならびに必要に応じてＧＡＰＤＨおよび標的遺伝子に対するＴａｑｍａｎプローブ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓおよびＩＤＴ）を使用してｑＰＣＲを行った。Ｔａｑｍａｎプローブおよびプライマーセットは一般に、Ｃａｓ１３またはｓｈＲＮＡ標的部位位置にわたってｃＤＮＡを増幅するように選択して、切断された転写物断片の検出を防止した（その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Konermann et al., Cell 173:1-12, 2018の表Ｓ４を参照のこと）。ｑＰＣＲを、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ ４８０ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ ＩＩ（Ｒｏｃｈｅ）を使用して、５μＬの多重化反応および３８４ウェルフォーマットで実施した。倍数の変化を、ｄｄＣｔ法を使用して、ＧＦＰトランスフェクトしたビヒクル対照と比較して計算した。多重比較補正を用いた一元配置または二元配置ＡＮＯＶＡを使用して、Ｐｒｉｓｍ ７を使用して転写物変化の統計的有意性を評価した。

【０２２９】

免疫組織化学

免疫組織化学的分析のために、Ｕ２ＯＳ細胞を、９６ウェルの光学的に透明なプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ Ｂｉｏ－Ｏｎｅ）上で培養し、以前に記載されたようにトランスフェクトし、次いで、ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）中に希釈した４％ＰＦＡ（Ｅｌｅｃｔｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）中で固定し、ＰＢＳ中０．３Ｍのグリシン（Ｓｉｇｍａ）で洗浄して、ＰＦＡをクエンチした。試料をブロッキングし、８％ロバ血清（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）、８％ヤギ血清（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）および０．３％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ １００（Ｓｉｇｍａ）を含有するＰＢＳ溶液中で１時間透過処理し、その後、１％ＢＳＡ（Ｆｉｓｈｅｒ Ｂｉｏｒｅａｇｅｎｔｓ）、１％ヤギ血清および０．２５％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ中で４℃で一晩の一次抗体インキュベーションを行った。試料を、０．１％ＢＳＡおよび０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ １００を含有するＰＢＳで３回洗浄し、その後、０．０５％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ １００および１％ＢＳＡを含むＰＢＳ中でフルオロフォアコンジュゲートした二次抗体と共に室温で１時間インキュベートした。細胞を、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘを含むＰＢＳで洗浄し、ＤＡＰＩで染色し、次いで、Ｍｏｕｎｔｉｎｇ Ｍｅｄｉａ（Ｉｂｉｄｉ）で覆って、その後イメージングした。一次抗体であるＨＡ－タグ６Ｅ２（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、２３６７）を、製造業者の使用説明書に従って１：１００希釈で使用した。使用した二次抗体は、ヤギ抗マウスＩｇＧ１－Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ ６４７（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、Ａ２１２４０）および抗マウスＩｇＧ１ ＣＦ ６３３（Ｓｉｇｍａ、ＳＡＢ４６００３３５）であった。共焦点画像を、Ｚｅｉｓｓ Ａｉｒｙｓｃａｎ ＬＳＭ ８８０を使用して撮影し、その後、Ｚｅｎ ２．３（Ｚｅｉｓｓ）で画像処理した。

【０２３０】

細菌小ＲＮＡシーケンシングおよび分析

Ｅ．ｃｏｌｉ ＤＨ５α細胞に、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．株に由来するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ｄ遺伝子座を有するｐＡＣＹＣ１８４を形質転換した。細胞

を、定常期に収集し、ＰＢＳ中ですすぎ、ＴＲＩｚｏｌ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中に再懸濁し、０．１mmシリカビーズを含有するＬｙｓｉｎｇ Ｍａｔｒｉｘ Ｂ管（ＭＰ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ）に移し、３回の３０秒サイクルでＢｅａｄ Ｍｉｌｌ ２４（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）でホモジナイズした。総ＲＮＡを、フェノール－クロロホルム抽出によって単離し、次いで、ＤｉｒｅｃｔＺｏｌ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製した。ＲＮＡ品質を、Ａｇｉｌｅｎｔ ２２００ Ｔａｐｅｓｔａｔｉｏｎとその後のＴｕｒｂｏ ＤＮａｓｅ処理（Ａｍｂｉｏｎ）とで評価した。総ＲＮＡを、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（ＮＥＢ）で処理し、細菌用Ｒｉｂｏ－Ｚｅｒｏ ｒＲＮＡ Ｒｅｍｏｖａｌ Ｋｉｔ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を使用して、ｒＲＮＡ枯渇させた。ＲＮＡを、ＲＮＡ ５’ポリホスファターゼで処理し、Ｅ．ｃｏｌｉポリ（Ａ）ポリメラーゼでポリ（Ａ）テイル付加し、Ｔ４ ＲＮＡリガーゼ１（ＮＥＢ）を使用して５’ＲＮＡシーケンシングアダプターとライゲーションさせた。ｃＤＮＡを、オリゴ－ｄＴプライマーおよびＭ－ＭＬＶ ＲＴ／ＲＮａｓｅ Ｂｌｏｃｋ（ＡｆｆｉｎｉｔｙＳｃｒｉｐｔ、Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用する逆転写を介して生成し、その後、ＰＣＲ増幅し、バーコード化した。得られたライブラリーを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑでシーケンシングし、カスタムＰｙｔｈｏｎスクリプトを使用して逆多重化し、Ｂｏｗｔｉｅ ２を使用してＣａｓ１３ｄ ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に対してアラインした。アライメントを、Ｇｅｎｅｉｏｕｓで視覚化した。

【０２３１】

Ｎｇｎ２レンチウイルス調製

低継代ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に、プレーティングの間にＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ培地中で、Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｉｍｉｎｅ Ｍａｘ（ＰＥＩ、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）ならびにＮｇｎ２標的プラスミド＋ｐＭＤＧ．２およびｐｓＰＡＸ２パッケージングプラスミド（Didier Tronoからの贈与、Ａｄｄｇｅｎｅ ＃１２２５９および＃１２２６０）をトランスフェクトした。次の日、培地を、無血清の化学的に規定された最小培地（Ｇｌｕｔａｍａｘを補充したＵｌｔｒａｃｕｌｔｕｒｅ、Ｌｏｎｚａ）に交換した。ウイルス上清を４８時間後に収集し、０．４５ミクロンＰＶＤＦフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を介して清澄化し、超遠心分離を使用して濃縮した。

【０２３２】

ＡＡＶ調製

低継代ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に、プレーティングの間にＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ培地中で、Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｉｍｉｎｅ Ｍａｘ（ＰＥＩ、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）ならびにＡＡＶ標的プラスミド＋ＡＡＶ１血清型およびｐＡｄＤｅｌｔａＦ６ヘルパーパッケージングプラスミド（ＵＰｅｎｎ Ｖｅｃｔｏｒ Ｃｏｒｅ）をトランスフェクトした。次の日、培地の６０％を、化学的に規定された最小培地（Ｇｌｕｔａｍａｘを補充したＵｌｔｒａｃｕｌｔｕｒｅ、Ｌｏｎｚａ）に交換した。４８時間後、ＡＡＶ含有上清を収集し、０．４５μｍ ＰＶＤＦフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を介して清澄化し、製造業者のプロトコールに従うポリエチレングリコール（ＰＥＧウイルス沈殿キット＃Ｋ９０４、Ｂｉｏｖｉｓｉｏｎ）による沈殿を使用して濃縮した。

【０２３３】

ＲＮＡ－ｓｅｑライブラリー調製およびシーケンシング

トランスフェクションの４８時間後、総ＲＮＡを、ＱｉａｇｅｎのＲＮｅａｓｙ Ｐｌｕｓ Ｍｉｎｉキットを使用して２９３ＦＴ細胞から抽出した。標準的なｍＲＮＡライブラリーを、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏｌａｂｓのＮＥＢＮｅｘｔ ＩＩ Ｕｌｔｒａ Ｄｉｒｅｃｔｉｏｎａｌ ＲＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｐｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｃａｔ＃Ｅ７７６０Ｓ）を使用して調製し、４２ｎｔのペアードエンド読み取りを用いてＩｌｌｕｍｉｎａ ＮｅｘｔＳｅｑ５００でシーケンシングした。１つの条件当たり約１５Ｍの総読み取りを逆多重化した。

【０２３４】

ＲＮＡ－ｓｅｑ分析

シーケンシングされた読み取りを、ＦＡＳＴＱＣを使用して品質試験し、２．５．１ｂＳＴＡＲアライナー（Dobin et al., 2013）を使用して、ｈｇ１９ヒトゲノムに対してアラインした。マッピングを、デフォルトパラメーター（読み取り１つ当たり最大１０個のミスマッチ、および読み取り１つ当たり最大９個のマルチマッピング位置）を使用して実施した。ゲノムインデックスを、ｈｇ１９ Ｉｌｌｕｍｉｎａ ｉＧｅｎｏｍｅｓコレクション（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）により提供される遺伝子アノテーションおよび１００のｓｊｄｂＯｖｅｒｈａｎｇ値を使用して構築した。独自にマッピングされた読み取りを、ＨＯＭＥＲ分析スイート（Heinz et al., 2010）を用いて、遺伝子発現の代理として最も多く発現されたアイソフォームを使用して全ての遺伝子エクソンにわたって定量し、三連を使用し、ＤＥＳｅｑ２ ｖ １．１４．１（Love et al., 2014）を用いて差次的遺伝子発現を実施して、群内分散を計算し、対比させて標的化条件と非標的化条件とを比較した。顕著な差次的に発現された遺伝子を、偽発見率（ＦＤＲ）＜０．０１およびｌｏｇ２倍数の変化＞０．７５を有すると定義した。Ｖｏｌｃａｎｏプロットを、含まれたプロッティングライブラリーおよびｓｃａｌｅｓ ０．５．０パッケージからのアルファ（）色関数を使用して、Ｒ ３．３．２で生成した。

【０２３５】

統計学

全ての値を、適切な図の説明文中に示されるように、平均±ＳＤまたは平均±ＳＥＭとして報告する。２つの群を比較するために、片側スチューデントｔ検定を使用し、統計的有意性を、アルファ＝０．０５を用いてＨｏｌｍ－Ｓｉｄａｋ法を使用して決定した。テューキーの多重仮説補正と共に一元配置ＡＮＯＶＡを使用して、２つよりも多い群間の有意性を評価した。２つの因子（すなわち、ＲＮＡ標的化モダリティおよびガイド位置）にわたって比較する場合、二元配置ＡＮＯＶＡを使用し、Ｓｉｄａｋの多重比較検定による多重仮説補正のために調整した。ダゴスティーノおよびピアソンの正規性検定により正規分布の仮定を満たさないことが見出された群を比較するために、ダンの多重比較調整を用いたノンパラメトリックフリードマン検定を実施した。ＰＲＩＳＭ ７．０を、全ての統計分析に使用した。試料サイズは、事前に決定しなかった。少なくとも３つの生物学的複製を、各図において具体的に示されるように、各実験に使用した。

【０２３６】

本明細書で報告されるシーケンシングデータは、ＧＥＯ Ｓｅｒｉｅｓ受託番号ＧＳＥ１０８５１９の下でＮＣＢＩ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｏｍｎｉｂｕｓ中に見出すことができる。

【０２３７】

配列などの、使用される材料および方法に関するさらなる詳細は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるKonermann et al., Cell 173:1-12, 2018中に見出すことができる。

【０２３８】

（実施例２）

ＶＩ型様Ｃａｓリボヌクレアーゼファミリーの計算的識別

この実施例は、クラス２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座のための計算的パイプラインを開発することによって、以前に検出されていないかまたは特徴付けられていないＲＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を識別するために使用される方法を記載し、これは、ＣＲＩＳＰＲ干渉のための単一のヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２ａ（以前にはＣｐｆ１）またはＣａｓ１３ａ（以前にはＣ２ｃ２）のみを必要とする（Makarova et al., 2015; Shmakov et al., 2015）。スペーサー獲得に関与する保存されたＣａｓ遺伝子のセットを発見することに焦点を当てたＣＲＩＳＰＲ系の生物情報学的マイニングのための以前の戦略（Shmakov et al., 2015）を改善するために、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座についての最低限の要件が、ＣＲＩＳＰＲリピートアレイおよび近隣エフェクターヌクレアーゼの存在であると定義された。検索アンカーとしてＣＲＩＳＰＲアレイを使用して、全ての原核生物ゲノムアセンブリおよびスキャフォールドをＮＣＢＩ ＷＧＳデータ

ベースから取得し、アルゴリズムをｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＲＩＳＰＲアレイ検出（Bland et al., 2007; Edgar, 2007; Grissa et al., 2007）に適応させて、２１，１７５個の推定ＣＲＩＳＰＲリピートアレイを識別した（図１Ａ）。

【０２３９】

各ＣＲＩＳＰＲアレイに隣接する最大２０キロベース（ｋｂ）のゲノムＤＮＡ配列を抽出して、直ぐ近傍にある予測されたタンパク質コード遺伝子を識別した。Ｃａｓ１２ａおよびＣａｓ１３ａを除いて、Ｃａｓ３またはＣａｓ９などの、公知のクラス１およびクラス２　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のシグネチャー遺伝子を含有する候補遺伝子座を、さらなる分析から排除して、パイプラインがこれらの公知のクラス２エフェクターファミリーを検出しクラスター化する能力を判断した。新たなクラス２　Ｃａｓエフェクターを識別するために、候補タンパク質は、＞７５０残基長かつリピートアレイの５タンパク質コード遺伝子内であることが必要であったが、これは、ＣＲＩＳＰＲリピートと密接に関連する大きいタンパク質が、公知の単一エフェクターの重要な特徴だからである。得られたタンパク質を、相同性に基づいて、単リンク階層的クラスタリングを使用して４０８個の推定タンパク質ファミリーへと分類した。

【０２４０】

ゲノム中の確率または全体的存在量に起因して、ＣＲＩＳＰＲアレイに密接に近接して存在するタンパク質クラスターを切り捨てるために、各クラスターに対するさらなる相同タンパク質を、ＮＣＢＩ非冗長タンパク質データベースおよび決定されたＣＲＩＳＰＲアレイに対するそれらの近接性から識別した。真のＣａｓ遺伝子はＣＲＩＳＰＲリピートとの高い同時出現率を有すると考えると、各拡張されたクラスターについてのタンパク質の＞７０％が、ＣＲＩＳＰＲリピートの２０ｋｂ以内に存在する必要があった。これらの残りのタンパク質ファミリーを、ヌクレアーゼドメインおよびモチーフについて分析した。

【０２４１】

最近記載されたＣａｓ１３ｂ系（Smargon et al., 2017）を含む候補のうち、２つの予測されたＨＥＰＮリボヌクレアーゼモチーフ（Anantharaman et al., 2013）を含有する候補ＣＲＩＳＰＲ関連リボヌクレアーゼをコードする特徴付けられていない推定クラス２　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のファミリーを識別した（図２Ａ）。重要なことに、これらは、今日までに記載された最も小さいクラス２　ＣＲＩＳＰＲエフェクター（約９３０ａａ）の中にある。ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３スーパーファミリーは、配列が多様な単一エフェクターシグネチャーヌクレアーゼ、および２つのＨＥＰＮドメインの存在によって実証される。これら２つのＲｘｘｘｘＨ　ＨＥＰＮモチーフ（図３Ａ）以外では、候補エフェクターは、以前に記載されたＣａｓ１３酵素に対する顕著な配列類似性を有さず、したがって、このファミリーの推定ＣＲＩＳＰＲリボヌクレアーゼは、ＶＩ型Ｃａｓ１３ｄまたはＶＩ型－Ｄと呼ばれる（図３Ｂ）。

【０２４２】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ｄ系は、腸常在微生物に由来するので、本発明者らは、最近の大規模マイクロバイオームシーケンシングの試みにより、アライメントを介してＣａｓ１３ｄファミリーをメタゲノムコンティグに拡張しようとした。予測されたオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）なしの公的メタゲノム配列に対するＣａｓ１３ｄタンパク質の比較により、いくつかの別個の分岐でクラスター化する、さらなる全長系ならびに複数のエフェクターおよびアレイ断片を識別した（図１Ｂ）。Ｃａｓ１３ｄタンパク質ファミリーの異なる分岐から、全長Ｃａｓ１３ｄオルソログタンパク質および遺伝子座を生成するために、ゲノムＤＮＡ試料を、関連するアセンブリおよび実施された標的化されたＳａｎｇｅｒシーケンシングから取得し、例えば、メタゲノムオルソログ「嫌気性消化器メタゲノム」（Ａｄｍ）（Treu et al., 2016）について、不完全なシーケンシング適用範囲に起因するギャップを埋めた。

【０２４３】

Ｃａｓ１３ｄ　ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の良性グラム陽性腸内細菌内で大部分がクラスター化されており、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座アーキテクチャ

ーの驚くべき多様性を示す（図２Ａ）。メタゲノムＡｄｍＣａｓ１３ｄ系を除いて、Ｃａｓ１３ｄ系は、それらのＣＲＩＳＰＲ遺伝子座内の重要なスペーサー獲得タンパク質Ｃａｓ１を欠いており（Yosef et al., 2012）、これは、Ｃａｓ１遺伝子もＣａｓ２遺伝子も要求しないクラス２ ＣＲＩＳＰＲ発見パイプラインの有用性を強調している。Ｃａｓ１３ｄダイレクトリピート（ＤＲ）は、長さおよび予測された二次構造において高度に保存されており（図３Ｃ）、３６ｎｔの長さ、Ａ／Ｕ－リッチループを有する８～１０ｎｔのステム、およびダイレクトリピートの３’末端における５’－ＡＡＡＡＣモチーフを有する（図３Ｄ）。この保存された５’－ＡＡＡＡＣモチーフは、ＩＩ型Ｃａｓ１／２スペーサー獲得複合体によって特異的に認識されることが示されている（Wright and Doudna, 2016）。実際、Ｃａｓ１は、一部のＣａｓ１３ｄ系に対して相対的に近接して見出され得るが（Ｐ１Ｅ０およびＲｆｘについては１０～３０ｋｂ以内）、残りのＣａｓ１３ｄ含有細菌は、別のＣＲＩＳＰＲ遺伝子座の一部として、それらのゲノム中の別の場所にＣａｓ１を含有する可能性が高い。

【０２４４】

（実施例３）

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ｄは、二重ＲＮａｓｅ活性を有する

Ｃａｓ１３ｄリピートアレイが転写され、ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）へとプロセシングされることを実証するために、Ｃａｓ１３ｄ ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座を、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．試料（Ｕｒ）から、細菌発現プラスミド中にクローニングした。ＣＲＩＳＰＲ系は、独立した発現のために必要な調節配列と共に、自己完結型のオペロンを形成する傾向があり、Ｅ．ｃｏｌｉにおける異種発現を促進する（Gasiunas et al., 2012）。ＲＮＡシーケンシング（Heidrich et al., 2015）により、３０ｎｔの５’ダイレクトリピートと、その後の１４～２６ｎｔ長の範囲の可変性の３’スペーサーとを有する、約５２ｎｔの成熟ｇＲＮＡへのアレイのプロセシングが明らかになった（図２Ｂ）。

【０２４５】

Ｃａｓ１３ｄ特性をｉｎ ｖｉｔｒｏで特徴付けるために、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｒａｅｕｍ Ｃａｓ１３ｄタンパク質（ＥｓＣａｓ１３ｄ）を、Ｅ．ｃｏｌｉにおけるそのロバストな組換え発現に基づいて精製したところ（図４Ａ～４Ｃ）、ＥｓＣａｓ１３ｄは、さらなるヘルパーリボヌクレアーゼなしに、そのマッチするＣＲＩＳＰＲアレイを構成要素ガイドへとプロセシングするのに単独で十分であったことが見出され（その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Konermann et al., " Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors," Cell 173:1-12, 2018の図２Ｃ、表Ｓ１）、これは、一部のクラス２ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系によって共有される特性である（East-Seletsky et al., 2016; Fonfara et al., 2016; Smargon et al., 2017）。さらに、ＨＥＰＮモチーフの正に荷電した触媒的残基（Anantharaman et al., 2013）を不活性化すること（ｄＣａｓ１３ｄ：Ｒ２９５Ａ、Ｈ３００Ａ、Ｒ８４９Ａ、Ｈ８５４Ａ）は、アレイプロセシングに影響を与えず、これは、Ｃａｓ１３ａと類似したｇＲＮＡバイオジェネシスを指示する別個のＲＮａｓｅ活性を示している（East-Seletsky et al., 2016; Liu et al., 2017）。

【０２４６】

Ｃａｓエフェクタータンパク質は、典型的には、成熟ｇＲＮＡと共に二元複合体を形成して、免疫防御のために外来核酸を切断することが可能なＲＮＡガイドされるサーベイランスリボ核タンパク質を生成する（van der Oost et al., 2014）。Ｃａｓ１３ｄが、２つのＨＥＰＮモチーフの存在によって示される、プログラム可能なＲＮＡ標的化活性を有するかどうかを評価するために、ＥｓＣａｓ１３ｄタンパク質を、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写される同族標的と一緒に、アレイまたは成熟ｇＲＮＡと対にした。ＲＮＡシーケンシング結果に基づいて、３０ｎｔのダイレクトリピートおよび２２ｎｔの中間のスペーサー長を含有する成熟ｇＲＮＡ（配列番号１２９のヌクレオチド６～３６と、その後のＲＮＡ標的に対して相補的な２２塩基）を選択した。

【０２４７】
Ｃａｓ１３ｄは、ガイド配列依存的な様式で、プロセシングされていないアレイおよび成熟ｇＲＮＡの両方と相補的な標的ｓｓＲＮＡを効率的に切断することができたが、マッチしていないスペーサー配列は、Ｃａｓ１３ｄ活性を消失させた（図５Ａ）。ｄＣａｓ１３ｄによる置換または切断反応へのＥＤＴＡの添加もまた、ガイド依存的ＲＮＡ標的化を消失させ、これは、Ｃａｓ１３ｄ標的化がＨＥＰＮおよびＭｇ$^{2+}$依存的であることを示している（図５Ｂ）。効率的なＣａｓ１３ｄ標的化のための最小のスペーサー長を決定するために、プロセシングされていない３０ｎｔ長から１０ｎｔに至るまでの範囲の一連のスペーサー短縮を生成した（図６Ａ）。切断活性は、２１ｎｔのスペーサー長を下回ると顕著に低下し、２２ｎｔのスペーサーの選択が確認された（図６Ｂ）。

【０２４８】
ＲＮＡを標的にするクラス２　ＣＲＩＳＰＲ系は、外来ＲＮＡのセンサーとして作用すると提唱されており（Abudayyeh et al., 2016; East-Seletsky et al., 2016）、このとき、エフェクターヌクレアーゼの通常のＲＮａｓｅ活性は、ガイドマッチする標的によって誘発される。Ｃａｓ１３ｄにおいて類似の特性についてアッセイするために、二元ＥｓＣａｓ１３ｄ：ｇＲＮＡ複合体のＲＮａｓｅ活性を、マッチするＲＮＡ標的の存在下でモニタリングした。ＥｓＣａｓ１３ｄは、標的ＲＮＡによって活性化されて、相補的ｓｓＲＮＡ標的に対するその活性と比較して非効率的ではあるが、バイスタンダーＲＮＡ標的を切断することができることが観察された（図３Ｃ）。マッチしていないバイスタンダー標的単独の存在では、切断を誘導するのに不十分であったが、ｄＣａｓ１３ｄの置換またはＥＤＴＡの添加は活性を消失させたので、バイスタンダー切断は、ガイド配列およびＨＥＰＮ依存的である。これらの結果は、バイスタンダーＲＮａｓｅ活性が、ＣＲＩＳＰＲ適応細菌免疫におけるＲＮＡを標的にするクラス２系の一般的な特性であり得ることを示している（図３Ｄ）。

【０２４９】
Ｃａｓ１３ｄリプログラミングの一般化可能性を評価するために、相補的ＲＮＡ標的をタイリングする１２個のガイドを生成したところ、全ての場合において効率的な切断が観察された（図７Ａ）。Ｃａｓ１３ｄは、ｓｓＲＮＡ標的のｓｓＤＮＡバージョン（図６Ｃ）もｓｓＲＮＡ標的のｄｓＤＮＡバージョン（図６Ｄ）も切断することができず、これは、Ｃａｓ１３ｄがＲＮＡ特異的ヌクレアーゼであることを示している。さらに、ＲＮＡ標的切断は、３’－Ｈ（Abudayyeh et al., 2016）または両面ＤＲ近位５’－Ｄおよび３’－ＮＡＮまたはＮＮＡ（Smargon et al., 2017）を必要とする他のＲＮＡを標的にするクラス２系とは対照的に、プロトスペーサー隣接配列（ＰＦＳ）に依存しなかった（図７Ａ）。アデニンＰＦＳに対するわずかなバイアスが最初に観察されたが（図６Ｅ）、一定のガイド配列を用い、標的ＰＦＳ塩基を変動させることは、標的化効率において有意な差異を生じなかった（Ｐ＝０．７６８）（図６Ｆ）。

【０２５０】
ＤＮＡを標的にするクラス２　ＣＲＩＳＰＲ系（Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012; Zetsche et al., 2015）および一部のＲＮＡを標的にするクラス１系は、標的－ガイド二重鎖と比較して、規定された位置において切断する傾向があるが（Samai et al., 2015; Zhang et al., 2016）、Ｃａｓ１３ｄ切断パターンは、異なる標的について変動し（図５Ａ、５Ｃ、６Ｈ）、ガイド配列の位置にかかわらず、顕著に類似したままである（図７Ａ）。これは、Ｃａｓ１３ｄが、標的ＲＮＡ中の特異的配列または構造的にアクセス可能な領域を優先的に切断し得ることを示している。Ｃａｓ１３ｄを、ヘアピンのループ領域中にまたは直鎖一本鎖リピートとして可変性のホモポリマーリピートを含有する標的に対する活性について試験した。ＥｓＣａｓ１３ｄは、両方の標的構造中のウラシル塩基への顕著な優先性を示し、全ての他の塩基では、活性はより低いが検出可能であった（図７Ｂ）。

【０２５１】
Ｃａｓ酵素は、広範な環境温度にわたる、ほぼ全ての古細菌および約半分の細菌におい

て見出されている（Hsu et al., 2014; van der Oost et al., 2014）。Ｃａｓ１３ｄ活性について最適な温度範囲を決定するために、１６～６２℃の様々な切断温度条件を試験したところ、２４～４１℃の範囲において最大の活性が観察された（図６Ｇ、６Ｈ）。この温度範囲は、広範な原核生物および真核生物宿主と適合性であり、このことは、Ｃａｓ１３ｄが、異なる細胞および生物においてＲＮＡ標的化のために適応され得ることを示している。

【０２５２】

（実施例４）

操作されたオルソログの、細胞ベースの活性スクリーニング

Ｃａｓ１３ｄヌクレアーゼを、哺乳動物細胞におけるプログラム可能なＲＮＡ標的化のための柔軟性のあるツールとして使用した。別個の細菌種由来のＣＲＩＳＰＲオルソログは、特に、ヒト細胞での異種発現の際に（Ran et al., 2015; Zetsche et al., 2017）、可変性の活性を共通して示す（Abudayyeh et al., 2017; East-Seletsky et al., 2017）。高度に活性なＣａｓ１３ｄオルソログを、真核生物細胞ベースのｍＣｈｅｒｒｙレポータースクリーニングにおいて識別した。

【０２５３】

Ｃａｓ１３ｄファミリー内の別個の分岐からの７つのオルソログ（図１Ｂ）のヒトコドン最適化されたバージョンを合成することによって、触媒的に活性なおよびＨＥＰＮ不活性なタンパク質を有する哺乳動物発現プラスミドを生成した。次いで、各タンパク質を、Ｎ末端およびＣ末端の核局在化シグナル（ＮＬＳ）に、必要に応じて融合させた。これらのＣａｓ１３ｄエフェクター設計をＨＡタグ化し、プロセシングされていないガイドＲＮＡ（プレｇＲＮＡ）を模倣する、２つのダイレクトリピート配列が隣接する３０ｎｔのスペーサー、または成熟ガイドＲＮＡを模倣すると予測される２２ｎｔのスペーサーを伴う３０ｎｔのダイレクトリピート（ｇＲＮＡ）のいずれかを有する、２つの別個のガイドＲＮＡアーキテクチャーと対にした（図８Ａ）。次いで、各ガイド設計について、ｍＣｈｅｒｒｙ転写物に対して相補的な４つの別個のスペーサー配列をプールして、標的化効率における潜在的なスペーサー依存的可変性を最小化した。Ｃａｓ１３ｄがｍＣｈｅｒｒｙタンパク質レベルをノックダウンする能力を、ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）２９３ＦＴ細胞ベースのレポーターアッセイにおいて決定した。

【０２５４】

トランスフェクションの４８時間後、フローサイトメトリーにより、ＲｆｘＣａｓ１３ｄおよびＡｄｍＣａｓ１３ｄが、非標的化対照ガイドと比較して、それぞれ最大で９２％および８７％（Ｐ＜０．０００３）、ｍＣｈｅｒｒｙタンパク質レベルを効率的にノックダウンしたことが示された（図８Ｂ）。対照的に、ＥｓＣａｓ１３ｄは、ＲａＣａｓ１３ｄおよびＲｆｆＣａｓ１３ｄと共に、ヒト細胞において限定された活性を示した。さらに、ＨＥＰＮ不活性なＲｆｘ－ｄＣａｓ１３ｄ構築物のいずれも、ｍＣｈｅｒｒｙ蛍光に顕著な影響を与えず、これは、ＨＥＰＮ依存的ノックダウンを示している（全ての場合についてＰ＞０．４３）。ＲｆｘおよびＡｄｍＣａｓ１３ｄ　ＮＬＳ融合構築物のロバストな核転座が免疫細胞化学を介して観察されたが、野生型エフェクターは、主に核外に残留する（図８Ｃ）。

【０２５５】

ＲｆｘＣａｓ１３ｄおよびＡｄｍＣａｓ１３ｄをリード候補として進めて、本発明者らは次に、それらが内因性転写物をノックダウンする能力を比較した。最適なオルソログおよびガイドアーキテクチャーを決定するために、ＲｆｘおよびＡｄｍＣａｓ１３ｄ構築物バリアントがβ－１，４－Ｎ－アセチル－ガラクトサミニルトランスフェラーゼ１（Ｂ４ＧＡＬＮＴ１）転写物を標的にする能力を、体系的にアッセイした。各条件において、Ｂ４ＧＡＬＮＴ１転写物をタイリングする別個のスペーサー配列を含有する４つのガイドをプールした。ＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ融合物は、野生型ＲｆｘＣａｓ１３ｄ、およびＡｄｍＣａｓ１３ｄの両方のバリアントよりも効率的にＢ４ＧＡＬＮＴ１を標的化し、ｇＲＮＡおよびプレｇＲＮＡの両方が、強力なノックダウンを媒介した（約８２％、Ｐ＜０

．０００１）（図８Ｄ）。したがって、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２由来のＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ（Ｃａｓ１３ｄ－ＮＬＳ ｆｒｏｍ Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ ｓｔｒａｉｎ ＸＰＤ３００２）を、残りの実験のために選択した（ＣａｓＲｘ）。

【０２５６】

（実施例５）

ＣａｓＲｘによる、ヒト細胞におけるプログラム可能なＲＮＡノックダウン

Ｃａｓ１３ｄは、それ自体のＣＲＩＳＰＲアレイをプロセシングすることが可能であるので、この特性を、単純な単一ベクター系での複数の標的化ガイドの同時送達のために活用した（図９Ａ）。ｍＲＮＡ（Ｂ４ＧＡＬＮＴ１およびＡＮＸＡ４）または核局在化したｌｎｃＲＮＡ（ＨＯＴＴＩＰおよびＭＡＬＡＴ１）の転写物を各々がタイリングする４つのスペーサーをコードするアレイは、ＣａｓＲｘによるロバストな（＞９０％）ＲＮＡノックダウンを一貫して促進した（Ｐ＜０．０００１）（図９Ｂ）。

【０２５７】

ＣａｓＲｘを、一過的トランスフェクションを介して、ＣａｓＲｘ媒介性ＲＮＡ干渉を、ｄＣａｓ９媒介性ＣＲＩＳＰＲ干渉（Gilbert et al., 2014; Gilbert et al., 2013）およびスペーサー配列がマッチしたｓｈＲＮＡ（図９Ｃ）と比較することによって、転写物のノックダウンまたは抑制のためのより確立されたテクノロジーと比較した。ＣＲＩＳＰＲｉベースの抑制について、以前の報告からのＢ４ＧＡＬＮＴ１についての最も強力なｄＣａｓ９ガイドを分析した（Gilbert et al., 2014; Zalatan et al., 2015）。３つの内因性転写物にわたって、ＣａｓＲｘは、各場合においてｓｈＲＮＡ（１１／１１）およびＣＲＩＳＰＲｉ（４／４）よりも優れており（図９Ｄ）、４８時間後に、ｓｈＲＮＡについての６５％およびＣＲＩＳＰＲｉについての５３％と比較して、９６％の中央値ノックダウンを示した。さらに、ＣａｓＲｘによるノックダウンを、２つの最近記載されたＣａｓ１３ａおよびＣａｓ１３ｂエフェクター（Abudayyeh et al., 2017; Cox et al., 2017）と比較した（図１０Ａ）。３つの遺伝子および８つのガイドＲＮＡにわたって、ＣａｓＲｘは、ＬｗａＣａｓ１３ａ－ｍｓｆＧＦＰ－ＮＬＳおよびＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＮＥＳの両方よりも顕著に高い転写物ノックダウンを媒介した（中央値：それぞれ８０％および６６％と比較して９７％、Ｐ＜０．０００１）（図１０Ｂ）。

【０２５８】

ＲＮＡｉは、単純な再標的化原理、スケーラブルな合成、ノックダウン効力、および試薬送達の容易さの組合せに起因して、目的の任意の遺伝子を破壊するために広く使用されてきた。しかし、広範なオフターゲット転写物サイレンシングが、内因性ｍｉＲＮＡ経路中へのＲＮＡｉ試薬の進入におそらくは起因して（Doench et al., 2003; Smith et al., 2017）、一貫した懸念となってきた（Jackson et al., 2003; Sigoillot et al., 2012）。これらの報告と一致して、Ｂ４ＧＡＬＮＴ１標的化ｓｈＲＮＡをトランスフェクトしたヒト細胞のＲＮＡシーケンシングの際に、非標的化ｓｈＲＮＡと比較して広範なオフターゲット転写変化が観察された（＞５００の顕著なオフターゲット変化、Ｐ＜０．０１、図９Ｅ、９Ｇ）。対照的に、スペーサーマッチしたＣａｓＲｘガイドＲＮＡのトランスクリプトームプロファイリングにより、標的化された転写物以外の顕著なオフターゲット変化は明らかにならなかった（図９Ｆ）。これは、ｉｎ ｖｉｔｒｏで観察された中程度のバイスタンダー切断（図５Ｃ）が、哺乳動物細胞において観察可能なオフターゲットトランスクリプトーム撹乱を生じない可能性があることを示している。ＡＮＸＡ４を標的化した場合に類似のパターンが観察され（図１１Ａ～１１Ｂ）、９００を超える顕著なオフターゲット変化が、ＣａｓＲｘによるゼロと比較して、ｓｈＲＮＡ標的化から生じた（図９Ｇ）。

【０２５９】

ＣａｓＲｘ干渉が広く適用可能であることを確認するために、がん、細胞シグナル伝達およびエピジェネティック調節において多様な役割を有する１１個のさらなる遺伝子のパ

ネルを選択し、遺伝子１つ当たり３つのガイドをスクリーニングした。ＣａｓＲｘは、９６％の中央値低減で、遺伝子にわたって高いレベルの転写物ノックダウンを一貫して媒介した（図９Ｈ）。各試験したガイドは、少なくとも８０％のノックダウンを媒介し、ＲＮＡ干渉についてのＣａｓＲｘ系の一貫性を強調している。

【０２６０】

（実施例６）

ｄＣａｓＲｘによるスプライスアイソフォーム操作

ＣａｓＲｘによるＲＮＡ標的化に関する実験により、標的ＲＮＡおよびタンパク質ノックダウンが、ＨＥＰＮドメインの触媒活性に依存することが明らかになった（図８Ｂ、５Ｂ）。ＣａｓＲｘによる効率的なノックダウンを媒介する同じガイド配列は、触媒的に不活性なｄＣａｓＲｘと対にした場合、ｍＣｈｅｒｒｙレベルを顕著に低減させることができず（図８Ｂ）、これは、ｍＲＮＡのコード部分へのｄＣａｓＲｘの標的化が、タンパク質翻訳を必ずしも撹乱させないことを示している。この観察は、転写物内の特異的コードおよび非コードエレメントの標的化のためにｄＣａｓＲｘを利用して、ＲＮＡを研究および操作する可能性を示した。この概念を検証するために、ｄＣａｓＲｘ系の有用性を、スプライスエフェクターを創出することによって拡張した。

【０２６１】

選択的スプライシングは、一般に、プレｍＲＮＡ中のシス作用性エレメントの、エクソンの包含または排除を媒介することができる陽性または陰性トランス作用性スプライシング因子との相互作用によって調節される（Matera and Wang, 2014; Wang et al., 2015）。かかるモチーフへのｄＣａｓＲｘ結合は、標的化されたアイソフォーム撹乱に十分であり得ると考えられた。概念実証のために、別個のスプライスエレメントを、選択的スプライシングされたエクソンに続く、２つの異なるリーディングフレームでｍＴａｇＢＦＰ２の上流にＤｓＲｅｄを含有する二色スプライシングレポーターにおいて識別した（Orengo et al., 2006）（図１２Ａ）。この２番目のエクソンの包含または排除は、リーディングフレームおよび生じる蛍光を切り替え、フローサイトメトリーによるスプライシングパターンの定量的読み出しを促進する。エクソンスキッピングを媒介するために、４つのガイドＲＮＡを設計して、エクソン２のイントロン分岐点ヌクレオチド、スプライスアクセプター部位、推定エクソンスプライスエンハンサーおよびスプライスドナーを標的化した。

【０２６２】

陰性スプライス因子の１つの広範なファミリーは、Ｃ末端のグリシン－リッチドメインを介してエクソン包含を典型的には阻害する、高度に保存された異種核リボ核タンパク質（ｈｎＲＮＰ）である（Wang et al., 2015）。スプライシングレポーターを、ｄＣａｓＲｘ、および最も豊富なｈｎＲＮＰファミリーメンバーの１つであるｈｎＲＮＰａ１のＧｌｙ－リッチＣ末端ドメインへの操作された融合物を用いて標的化した（図１２Ｂ）。

【０２６３】

ガイド位置は、操作されたエクソンスキッピングの効率の主要な決定因子のようである。各ガイド位置は、非標的化ガイドと比較して、エクソン排除における顕著な増加（全ての場合においてＰ＜０．０００１）を媒介したが、スプライスアクセプターの標的化は、最も強力なエクソン排除を生じた（８％の基底スキッピングから、ｄＣａｓＲｘ単独について６５％およびｈｎＲＮＰａ１融合物について７５％への増加）。比較として、ｄＬｗａＣａｓ１３ａ－ｍｓｆＧＦＰ－ＮＬＳは、４つ全ての位置にわたって、顕著に低いレベルのエクソンスキッピングを媒介した（スプライスアクセプターガイドについて１９％のスキッピング）（図１０Ｃおよび１０Ｄ、Ｐ＜０．０００１）。

【０２６４】

ＣＲＩＳＰＲアレイを用いて４つ全ての位置を同時に標的にすることは、個々のガイド単独よりも高いレベルのエクソンスキッピングを達成した（ｄＣａｓＲｘについて８１％およびｈｎＲＮＰａ１融合物について８５％、ＳＡガイドと比較してＰ＜０．００６）（図１２Ｂ）。これらの結果は、ｄＣａｓＲｘが、ガイド配置を変動させることを介したア

イソフォーム比のチューニングを可能にすることを示し、特異的ＲＮＡエレメントの標的化および操作のために、ヒト細胞において効率的なＲＮＡ結合性モジュールとしてこれが活用され得ることを示唆している。

【０２６５】

（実施例７）

前頭側頭葉型認知症のニューロンモデルへのｄＣａｓＲｘのウイルス送達

Ｃａｓ１３ｄファミリーは、Ｃａｓ９（サブタイプに依存して約１１００ａａ～約１４００ａａ、コンパクトな外れ値、例えば、ＣｊＣａｓ９またはＳａＣａｓ９を有する）、Ｃａｓ１３ａ（１２５０ａａ）、Ｃａｓ１３ｂ（１１５０ａａ）およびＣａｓ１３ｃ（１１２０ａａ）とは対照的に、平均して９３０アミノ酸長である（図３Ｂ）（Chylinski et al., 2013; Cox et al., 2017; Hsu et al., 2014; Kim et al., 2017; Shmakov et al., 2015; Smargon et al., 2017）。アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、その広範なカプシド血清型、低レベルの挿入突然変異誘発、および明らかな病原性の欠如に起因して、導入遺伝子送達および遺伝子治療のための多用途のビヒクルであるが、その限定的なパッケージング容量（約４．７ｋｂ）により、多くの単一エフェクターＣＲＩＳＰＲ酵素を効果的に送達することは困難である（Abudayyeh et al., 2017; Ran et al., 2015; Swiech et al., 2015）。Ｃａｓ１３ｄエフェクターの顕著に小さいサイズにより、これらは、ＣＲＩＳＰＲアレイ、必要に応じたエフェクタードメイン、および必要な発現または調節エレメントを伴った、一体型のＡＡＶ送達に独自に適したものになっている（図１２Ｃ）。

【０２６６】

第１７染色体に連結したパーキンソニズムを伴う前頭側頭葉型認知症（ＦＴＤＰ－１７）は、タウをコードする遺伝子であるＭＡＰＴ中の多様な点突然変異によって引き起こされる、常染色体優性の主要な神経変性疾患である。タウは、ヒトニューロンにおいて、２つの主要なアイソフォーム４Ｒおよび３Ｒとして存在し、これらは、タウエクソン１０の存在または非存在によって識別され、したがって、４つまたは３つの微小管結合性ドメインを含有する。これら２つのアイソフォームのバランスは、一般に、ＦＴＤＰ－１７ならびに他のタウオパチーにおいて撹乱され、これが、神経変性の進行を駆動する（Boeve and Hutton, 2008）。ＦＴＤの一部の形態は、ＭＡＰＴエクソン１０に続くイントロン中の突然変異によって引き起こされ、これが、イントロンスプライスサイレンサーを破壊し、４Ｒタウの発現を上昇させ（Kar et al., 2005）、それによって、病理学的変化を誘導する（Schoch et al., 2016）。

【０２６７】

ＭＡＰＴエクソン１０に標的化されたｄＣａｓＲｘは、エクソン排除を誘導して、調節不全の４Ｒ／３Ｒタウ比を緩和することができると考えられた。患者由来のヒト誘導多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）を、２週間ニューロゲニン－２により指示された分化を介して、皮質ニューロンへと分化させた（Zhang et al., 2013）。次いで、有糸分裂後ニューロンに、エクソン１０スプライスアクセプターおよび２つの推定エクソンスプライスエンハンサー（図１２Ｅ）を標的にする３つのスペーサーを含有するリピートアレイと対にした、ｄＣａｓＲｘを有するＡＡＶ１を形質導入した（図１２Ｄ）。ｄＣａｓＲｘ媒介性エクソン排除は、相対的４Ｒ／３Ｒタウ比を、ＢＦＰビヒクル対照と比較してほぼ５０％（図１２Ｆ）、罹患していない対照ニューロンと類似のレベルまで低減させることができ、これは、ＣａｓＲｘが、ＡＡＶ送達を介して初代細胞型において転写モジュレーションに利用され得ることを実証している。

【０２６８】

（実施例８）

Ｃａｓ１３ｄを使用したヒト細胞におけるＲＮＡ標的化

ＲＮＡは、活性なＣａｓ１３ｄヌクレアーゼを使用して、ヒト細胞において標的化され得る。概念実証として、ヒトＵ－２　ＯＳ骨肉腫細胞に、ｍＣｈｅｒｒｙレポーターを安定に組み込み、ｍＣｈｅｒｒｙ転写物を標的にする、ヒトコドン最適化されたＣａｓ１３

ｄおよびガイドＲＮＡをコードするプラスミドをトランスフェクトした（図１３）。
【０２６９】
核局在化がｍＣｈｅｒｒｙノックダウンに影響を与えることができるかどうかを理解するために、Ｃａｓ１３ｄタンパク質をまた、Ｎ末端およびＣ末端ＮＬＳ配列（Ｎ末端ＮＬＳについてＳＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳ、配列番号２５６、Ｃ末端ＮＬＳについてＧＰＫＫＲＫＶＡＡＡ、配列番号２５８）と融合させた（これらは、２ｘＮＬＳ構築物と称される）。ガイドＲＮＡを、プロセシングされていないＣＲＩＳＰＲガイドアレイを模倣する３６ｎｔのＤＲ－３０ｎｔのスペーサー－３６ｎｔのＤＲ配列（ＤＲ３６と称される）またはプロセシングされた成熟ｇＲＮＡを模倣する３０ｎｔのＤＲ－２２ｎｔのスペーサー（ｇＲＮＡと称される）に作動可能に連結したＵ６プロモーターを有するベクター中で提供した。ＤＲ３６構築物は、Ｃａｓ１３ｄによって細胞内で成熟ｇＲＮＡへとプロセシングされると推定される。ＤＲ３６またはｇＲＮＡ分子内のスペーサー配列は、ｍＣｈｅｒｒｙ標的ＲＮＡに対して相補的であるか（オンターゲットｍＣｈｅｒｒｙ）、またはｍＣｈｅｒｒｙもしくは任意の内因性ヒト転写物に対する相補性を回避するために計算的に最適化された（非標的化ｍＣｈｅｒｒｙ）かのいずれかであった。
【０２７０】
ｍＣｈｅｒｒｙノックダウンを、フローサイトメトリーを介して定量し、トランスフェクション対照に対して標準化した。非標的化ｍＣｈｅｒｒｙガイドは、おそらくはｍＣｈｅｒｒｙ転写物が標的化されないことに起因して、フローサイトメトリーを介したｍＣｈｅｒｒｙタンパク質レベルに影響を与えない。しかし、４つの異なるＣａｓ１３ｄオルソログと対にしたオンターゲットｍＣｈｅｒｒｙガイドは、顕著なｍＣｈｅｒｒｙノックダウンを示した（図１３）。「ＸＰＤ」は、Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ ＸＰＤ３００２ Ｃａｓ１３ｄを指し；「Ｐ１Ｅ０」は、消化管メタゲノムＰ１Ｅ０ Ｃａｓ１３ｄを指し；「ＡｎＤｉｇ」は、嫌気性消化器消化管メタゲノムＣａｓ１３ｄを指し；「無培養」は、無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．Ｃａｓ１３ｄを指す。
【０２７１】
（実施例９）
Ｃａｓ１３ｄを使用したｉｎ ｖｉｖｏ ＲＮＡ標的化
ＲＮＡは、がんのマウスモデルにおいて標的化され得る。マウス中のどの細胞がＥＧＦＲを発現しているかを観察するために、マウスＥＧＦＲに対して相補的な１つまたは複数のスペーサー領域を含むガイドＲＮＡを設計し、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＣａｓ１３ｄ（例えば、配列番号２または４）、およびビオチン標識と組み合わせる。ｇＲＮＡおよびＣａｓ１３ｄコード配列を、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルス）中にクローニングし、これを使用して、１００％の感染率を保証する力価で、尾静脈注射によってマウスに感染させる。蛍光ストレプトアビジン標識をマウスに投与する。ＥＧＦＲを発現している細胞を視覚化し、蛍光標識に適切な励起周波数を用いて検出する。あるいは、Ｃａｓ１３ｄを、その活性な形態でｉｎ ｖｉｖｏ送達して、標的ノックダウンを媒介する。
【０２７２】
（実施例１０）
がんの処置
組織学的に確認されたステージ１のＥＧＦＲ＋乳がんを有するヒト対象は、開示された方法で処置され得る。各対象に、乳腺腫瘍摘出手術を受けた後に、ＨＥＰＮドメインが突然変異した活性なＣａｓ１３ｄまたはＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）、ＥＧＦＲを標的にするガイドＲＮＡおよび毒素を含む複合体を投与する。処置された個体を、乳がん再発についてモニタリングする。
【０２７３】
（実施例１１）
ＨＩＶ感染の処置

ＨＩＶ感染を有するヒト対象は、開示された方法で処置され得る。各対象に、ＨＥＰＮドメインが突然変異した活性なＣａｓ１３ｄまたはＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）、ＨＩＶ　Ｎｅｆタンパク質を標的にするガイドＲＮＡおよび毒素を含む構築物を投与する。処置された個体を、ＨＩＶ進行についてモニタリングする。

【０２７４】

（実施例１２）

ハンチントン病の処置

ハンチントン病を有するヒト対象は、開示された方法で処置され得る。各個体に、Ｃａｓ１３ｄ、ハンチントン突然変異を標的にするガイドＲＮＡを含む構築物を投与する。処置された個体を、疾患進行についてモニタリングする。

【０２７５】

（実施例１３）

Ｃａｓ１３ｄを使用する選択的スプライシング

Ｃａｓ１３ｄスプライスエフェクターは、治療的タンパク質の回復（例えば、これは、突然変異または欠失から生じる）、フレームシフト誘導を介した遺伝子ノックダウン、所望のアイソフォーム比をチューニングもしくは回復させる、または所望の優性スプライスアイソフォームを誘導するために使用され得る（図１４）。選択的スプライシングは、一般に、プレｍＲＮＡ中のシス作用性エレメントの、エクソンの包含または排除を媒介することができる陽性または陰性トランス作用性スプライシング因子との相互作用によって調節される。陽性または陰性スプライシング因子への必要に応じた融合を伴うｄＣａｓ１３ｄおよびＣａｓ１３ｄは、スプライシングを操作するために、プレｍＲＮＡ中の前記シス作用性エレメントを標的にするスプライシングエフェクターとして使用され得る。かかるエレメントには、エクソンスプライシングエンハンサーまたはサプレッサー、イントロンスプライシングエンハンサーまたはサプレッサー、スプライスアクセプターおよびスプライスドナー部位、ならびにより一般には、その特定のプレｍＲＮＡ、ｍＲＮＡまたは他のＲＮＡ種、例えば、非コードＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｍｉＲＮＡなどの上のタンパク質相互作用性またはＲＮＡ相互作用性のモチーフまたはエレメントが含まれ得る。

【０２７６】

さらに、Ｃａｓ１３ｄベースのスプライスエフェクターの効果は、ガイド位置依存的であり得る。これは、立体障害、遮断、動員またはエフェクター媒介性相互作用を介して、ＲＮＡ転写物中の特定のモチーフまたは部位、例えば、タンパク質結合性部位を撹乱させるまたは発見するために利用され得る。例えば、非コードＲＮＡと特定のクロマチンリモデリング複合体との間の相互作用が、撹乱され得る。リボソーム結合性部位および他のエレメントのアクセスは、翻訳を減少、増加、または他の方法で操作するために、５’または３’ＵＴＲにおいて（または適切なエフェクタードメインを動員するために）遮断され得る。

【０２７７】

Ｃａｓ１３ｄガイドをプレｍＲＮＡに沿って標的化またはタイリングすることは、新たなシス作用性エレメント、例えば、イントロンまたはエクソンスプライスエンハンサーを発見またはマッピングするために使用され得る。これは、最適なアンチセンスオリゴヌクレオチド位置付けのために、ジストロフィン遺伝子の場合には治療的文脈で利用されており、最適なＣａｓ１３ｄ位置付けのためにも使用され得る。これは、輸送および局在化、クロマチンリモデリング、ポリアデニル化、ＲＮＡの安定性および半減期、またはナンセンス媒介性減衰のレベルに影響を与えるために、ＲＮＡジップコードまたは他のシス作用性エレメントをマッピング、マスク、または他の方法で撹乱させるためにも使用され得る。

【０２７８】

一例では、ＲＮＡを標的にすることは、標的ＲＮＡのスプライシングを変化させることを可能にする。スプライスアクセプターおよび／またはドナー部位ならびにスプライスエフェクタードメインの直接的結合は共に、スプライシングを操作するために使用され得る

。例えば、突然変異したＨＥＰＮドメインを有するｄＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２または４）、標的ＲＮＡに特異的な少なくとも１つのスペーサー配列を含有するガイドＲＮＡ、および必要に応じて、スプライシングに影響を与えるエフェクタードメイン（例えば、ＳＲＳＦ１のＲＳ－リッチドメイン、ｈｎＲＮＰＡ１のＧｌｙ－リッチドメイン、ＲＢＭ４のアラニン－リッチモチーフ、またはＤＡＺＡＰ１のプロリン－リッチモチーフ）を使用することによって、ＲＮＡの選択的スプライシングが達成され得る。

【０２７９】

一部の例では、かかる方法は、エクソン包含のため、例えば、ポンペ病を処置するために酸性アルファ－グルコシダーゼ（ＧＡＡ）のエクソン２を含むために、または脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）を処置するためにＳＭＮ２のエクソン７を含むために使用される。一部の例では、かかる方法は、エクソン排除のため、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを処置するためにジストロフィンのリーディングフレームを回復させるため、がんを処置するために抗アポトーシス性の長いアイソフォームからアポトーシス促進性の短いアイソフォームへとＢｃｌ－ｘプレｍＲＮＡのスプライシングをシフトさせるため、３Ｒおよび４Ｒタウの比に影響を与えるためにＭＡＰＴ転写物のスプライシングをシフトさせるため、またはハッチンソン・ギルフォード早老症候群または加齢の他の遺伝性疾患の場合にはラミンＡ転写物のスプライシングを操作するために使用される。

【０２８０】

一部の例では、方法は、スプライスアクセプターまたはドナー部位をマスクするため、例えば、コールドの腫瘍をホットにするためのネオ抗原を創出するために、突然変異したＨＥＰＮドメインを必要に応じて有するＣａｓ１３ｄタンパク質を使用する。ある特定の標的プレｍＲＮＡのスプライシングに影響を与えることによって、この方法は、がん細胞におけるネオエピトープの創出をもたらし得る新規エクソン－エクソン接合部を生成することができる。これは、非天然抗原のディスプレイに起因して、がん細胞を、免疫系に対して脆弱なものにすることができる。他の例では、この方法は、アイソフォーム比を動的に操作するため、またはタンパク質（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーについてはジストロフィン）のリーディングフレームを回復させるために使用され得る。

【０２８１】

（実施例１４）

ＣａｓＴ１３ｄのＡＡＶ送達

上の実施例に記載されるように、Ｃａｓ１３ｄは、プラスミド送達に適さない細胞型における発現を媒介するため、またはＣａｓ１３ｄのｉｎ　ｖｉｖｏ送達のために、ＡＡＶ中に効果的にパッケージングされ得る。ヌクレアーゼ活性ＣａｓＴ１３ｄのＡＡＶ送達は、目的の細胞型においてＲＮＡ標的ノックダウンを媒介するために使用され得る。他の単一エフェクターＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼと比較したその小さいサイズに起因して、Ｃａｓ１３ｄは、単一のＡＡＶベクター中に、ガイドＲＮＡ、または複数のガイドＲＮＡを含有するアレイと一緒にパッケージングされ得る。

【０２８２】

（実施例１５）

Ｃａｓ１３ｄを用いた核酸ベースの診断薬

Ｃａｓ１３ｄ酵素は、リボ核タンパク質複合体の形成を促進するために、細胞に由来する無細胞溶解物、または操作されたＣａｓ１３ｄ酵素およびガイドＲＮＡを含有する無細胞系を使用して、細胞との関連で、核酸ベースの診断薬として利用され得る。前記ガイドＲＮＡは、プレガイドＲＮＡ、成熟ガイドＲＮＡ、または１つもしくは複数のスペーサー配列を含有するアレイの形態で、提供され得る。構成成分は、必要な構成成分の生成を促進するために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写／翻訳系を介して、Ｃａｓ１３ｄ酵素および適切なガイドＲＮＡ設計をコードするＤＮＡまたはＲＮＡ前駆体の形態でも提供され得る。診断キットのこれらの構成成分は、「センサー」モジュールを含む。

【０２８３】

かかる方法は、標的ＲＮＡが試験試料中に存在するかどうかを決定するために使用され

得る。かかる方法は、病原体、例えば、ウイルスまたは細菌を検出する、またはがんなどの疾患状態を診断するためにも使用され得る（例えば、ここで、標的ＲＮＡは、特定の微生物または疾患に特異的である）。かかる方法は、環境試料または農業試料、例えば、種子または土壌の純度または正体を試験するためにも使用され得る。

【０２８４】

次いで、「センサー」モジュールに、ＲＮＡの形態の試験試料を負荷する。前記試験試料は、例えばｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写を介してＲＮＡに変換されるゲノムＤＮＡ試料、または直接的ＲＮＡ試料であり得るがこれらに限定されない。これらの試料は、生物学的材料、例えば、患者試料（例えば、細胞、組織、血液、血漿、血清、唾液、尿、腫瘍生検、無細胞ＤＮＡもしくはＲＮＡ、エクソソーム、担体小胞または粒子）および環境試料（例えば、土壌、水、空気、種子または植物試料）から抽出され得る。診断感度を改善するための一実施形態では、試料中の核酸分子は、増幅技術、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅、ループ媒介性等温増幅、核酸配列ベースの増幅、鎖置換増幅、ローリングサークル増幅、リガーゼ連鎖反応およびその他（例えば、等温増幅を使用するもの）を使用して増幅される。前記増幅技術は、必要に応じて、核酸変換技術、例えば、ランダム化されたプライマーまたは標的化されたプライマーを用いる転写または逆転写を用いることができる。

【０２８５】

センサーモジュールが試験試料中の同族標的を認識すると、これは、ＲＮａｓｅ活性を活性化する。このＲＮａｓｅ活性は、検出可能な標識を使用することによって検出され得る。一例では、検出可能な標識には、フルオロフォアおよびクエンチャーに連結されたＲＮＡが含まれる。インタクトな検出可能なＲＮＡは、フルオロフォアおよびクエンチャーを連結して、蛍光を抑制する。Ｃａｓ１３ｄによる検出可能なＲＮＡの切断の際に、フルオロフォアは、クエンチャーから放出され、検出可能な蛍光活性を示す。

【０２８６】

別の例では、レポーターＲＮＡの切断は、非蛍光分子を放出し、これが、可視シグナル（例えば、目に見える）へと変換され得る。一例では、レポーターＲＮＡの切断は、側方流動を介して検出され得る分子を放出する。側方流動によって検出され得る分子は、抗体が特異的に結合し得る任意の分子である。一例では、Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、標的を検出するガイドＲＮＡおよびレポーター分子にコンジュゲートされたレポーターＲＮＡと共に、乾燥試験ストリップの形態で、単一の系として送達され得る。試験試料とのインキュベーションの際に、Ｃａｓ１Ｃａｓ１３ｄタンパク質ａ３ｄ、ガイドＲＮＡおよびレポーターＲＮＡは、ＲＮＡ標的の存在下で再水和される。Ｃａｓ１３ｄタンパク質は、レポーターＲＮＡを切断して、側方流動を介した試験ストリップにおけるレポーター分子の遊走、およびそこに局在した抗体への結合によって生じる陽性試験ラインシグナルを生じる。特別な（凍結）貯蔵を必要としないかかる貯蔵安定性の乾燥検出システムは、例えば、標的ＲＮＡまたはＤＮＡの検出が、中央集中型の実験施設の外側、例えば、診療所、病院、薬局、農業状況などにおける野外作業の間に実施される状況において有利であると証明され得る。

【０２８７】

Ｃａｓ１３ｄは、広範な温度にわたって活性であり、制御された実験室環境の外側でのかかる適用を実現可能にしている。

【０２８８】

（実施例１６）

ＲＮＡ、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏでＲＮＡへと転写されるＤＮＡについての診断薬としてのＣａｓ１３ｄ

Ｃａｓ１３ｄは、最小の診断的なｉｎ　ｖｉｔｒｏ系において、マッチした標的ＲＮＡの存在を可視シグナルへと変換することが可能である。図１５Ａ～１５Ｄ（Ａ）Ｃａｓ１３ｄは、ガイドＲＮＡのスペーサー配列とマッチする標的を結合した際に、活性なＲＮａｓｅ複合体へと変換される。これは、ｇＲＮＡ相補的標的ＲＮＡまたは非相補的バイスタ

ンダーＲＮＡを切断することが可能である。（Ｂ）Ｃａｓ１３ｄ標的依存的ＲＮａｓｅ活性は、例えば、Ｃａｓ１３ｄガイドＲＮＡのスペーサーとマッチする標的の存在下でのみ切断される標識された検出用ＲＮＡの切断を介して、検出可能なシグナルへと変換され得る。この例では、検出用ＲＮＡは、フルオロフォア「Ｆ」および蛍光を消失させるクエンチャー「Ｑ」を含有する。フルオロフォアがクエンチャーから遊離され、蛍光が生成されるのは、バイスタンダーＲＮＡ切断の際のみである。（Ｃ）Ｅ．ｓｉｒａｅｕｍ由来のＣａｓ１３ｄは、完全にマッチした標的の存在下でのみ可視シグナルを生じ、異なるミスマッチした標的の存在下では可視シグナルを生じない。（Ｄ）Ｒ．ｆｌａｖｅｆａｃｉｅｎｓ株ＸＰＤ３００２由来のＣａｓ１３ｄは、完全にマッチした標的の存在下でのみ可視シグナルを生じ、異なるミスマッチした標的の存在下では可視シグナルを生じない。

【０２８９】

したがって、本明細書で開示される系は、診断において使用され得る側方流動デバイス（または他の固体支持体）の一部であり得る。ＲＮＡまたはＤＮＡ配列の存在は、従来の側方流動によって次いで検出され得るシグナルへと変換され得る。

【０２９０】

（実施例１７）

Ｃａｓ１３ｄ改変

図１６Ａ～１６Ｂ、Ｃａｓ１３ｄは、オルソログ間で低い保存を有する領域の短縮を含む改変に適している。図１６Ａ中のＣａｓ１３ｄオルソログのアライメントは、高い（緑色の棒）および低い（赤色の棒）保存を有する領域を示す。

【０２９１】

（実施例１８）

ｉｎ　ｖｉｖｏで転写物を標的にする

細菌細胞中のｃｃｄＢ遺伝子を、異なるｎＣａｓ１オルソログ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ　ｎＣａｓ１（Ｅｓ＿ｎＣａｓ１；配列番号１）；突然変異したＨＥＰＮドメインを有するＥｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ　ｎＣａｓ１（Ｅｓ＿ｎＣａｓ１　ＨＥＰＮ－／－；配列番号２）；無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ｎＣａｓ１（ｕｎｃｕｌ＿ｎＣａｓ１；配列番号３）および突然変異したＨＥＰＮドメインを有する無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ｎＣａｓ１（ｕｎｃｕｌ＿ｎＣａｓ１　ＨＥＰＮ－／－；配列番号４）を使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏで標的化した（図１７Ａ）。化学的にコンピテントなＥ．ｃｏｌｉ（株ＢＷ２５１４１－ＤＥ３）細胞に、（１）アラビノース誘導性ｃｃｄＢプラスミド、ならびに（２）適合性の複製起点、ｎＣａｓ１タンパク質コード配列、およびｃｃｄＢ転写物を標的にする４つのスペーサー配列を含有するｎＣａｓ１ガイドアレイを有する第２のプラスミド（標的化ベクター）を形質転換した（図１７Ａ）。

【０２９２】

１．ｃｃｄＢを標的にする人工Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｉｒａｅｕｍ　ｎＣａｓ１アレイ

【化３】

a. **GAACUACACCCGUGCAAAAAUGCAGGGGUCUAAAACUAACGGCUCUCUCUU**
UUAUAGGUGUAAACCGAACUACACCCGUGCAAAAAUGCAGGGGUCUAAAA
CCUUUAUCUGACAGCAGACGUGCACUGGCCAGAACUACACCCGUGCAAAAA
UGCAGGGGUCUAAAACCAUCAUGCGCCAGCUUUCAUCCCCGAUAUGGAACU
ACACCCGUGCAAAAAUGCAGGGGUCUAAAACUAAUGGCGUUUUUGAUGUCA
UUUUCGCGGUCCGCUGA (配列番号 261)

i. 完全36ntのダイレクトリピート:

GAACUACACCCGUGCAAAAAUGCAGGGGUCUAAAAC (配列番号 262)

ii. スペーサー1: UAACGGCUCUCUCUUUUAUAGGUGUAAACC (配列番号 263)

iii. スペーサー2: CUUUAUCUGACAGCAGACGUGCACUGGCCA (配列番号 264)

iv. スペーサー3: CAUCAUGCGCCAGCUUUCAUCCCCGAUAUG (配列番号 265)

v. スペーサー4: UAAUGGCGUUUUUGAUGUCAUUUUCGCGGUCCGCUGA
(配列番号 266)

【０２９３】

２．ｃｃｄＢを標的にする人工無培養Ｒｕｍｉｎｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ｎＣａｓ１アレイ

【化４】

a. **CUACUACACUGGUGCAAAUUUGCACUAGUCUAAAACUAACGGCUCUCUCUU**
UUAUAGGUGUAAACCCUACUACACUGGUGCAAAUUUGCACUAGUCUAAAAC
CUUUAUCUGACAGCAGACGUGCACUGGCCACUACUACACUGGUGCAAAUUU
GCACUAGUCUAAAACCAUCAUGCGCCAGCUUUCAUCCCCGAUAUGCUACUAC
ACUGGUGCAAAUUUGCACUAGUCUAAAACUAAUGGCGUUUUUGAUGUCAUU
UUCGCGGUCCGC (配列番号 267)

i. 完全36ntのダイレクトリピート:

CUACUACACUGGUGCAAAUUUGCACUAGUCUAAAAC (配列番号 268)

ii. スペーサー1: UAACGGCUCUCUCUUUUAUAGGUGUAAACC (配列番号 269)

iii. スペーサー2: CUUUAUCUGACAGCAGACGUGCACUGGCCA (配列番号 270)

iv. スペーサー3: CAUCAUGCGCCAGCUUUCAUCCCCGAUAUG (配列番号 271)

v. スペーサー4: UAAUGGCGUUUUUGAUGUCAUUUUCGCGGUCCGCUGA
(配列番号 272)

【０２９４】

３．標的ＲＮＡ（ｃｃｄＢ配列）

【化５】

a. AUGCAGUUUAAGGUUUACACCUAUAAAAGAGAGAGCCGUUAUCGUCUGUUU
GUGGAUGUACAGAGUGAUAUUAUUGACACGCCCGGGCGACGGAUGGUGAUCC
CCCUGGCCAGUGCACGUCUGCUGUCAGAUAAAGUCUCCCGUGAACUUUACC
CGGUGGUGCAUAUCGGGGAUGAAAGCUGGCGCAUGAUGACCACCGAUAUG
GCCAGUGUGCCGGUCUCCGUUAUCGGGGAAGAAGUGGCUGAUCUCAGCCACC
GCGAAAAUGACAUCAAAAACGCCAUUAACCUGAUGUUUUGGGGAAUA
(配列番号 273)

i.スペーサー1 標的 : GGUUUACACCUAUAAAAGAGAGAGCCGUUA
(配列番号 274)

ii.スペーサー2 標的 : UGGCCAGUGCACGUCUGCUGUCAGAUAAAG
(配列番号 275)

iii.スペーサー3 標的 : CAUAUCGGGGAUGAAAGCUGGCGCAUGAUG
(配列番号 276)

iv.スペーサー4 標的 : ACCGCGAAAAUGACAUCAAAAACGCCAUUA
(配列番号 277)

v. dCas9 標的 (下線): UUAUCGUCUGUUUGUGGAUG (配列番号 259)

【０２９５】

形質転換された細菌を、２ｍＭアラビノースプレート上にプレートして、ｃｃｄＢ発現を誘導し、２４時間後に収集した。総ＲＮＡを、Ｔｒｉｚｏｌを用いて抽出し、その後、ランダムヘキサマー媒介性の逆転写およびＴａｑｍａｎプローブベースのｑＰＣＲを行った。

【０２９６】

各ｎＣａｓ１タンパク質中の２つのＨＥＰＮドメインの突然変異は、ｃｃｄＢの標的化を示さないが（図１７Ｂ、ＨＥＰＮ－／－）、活性な野生型ｎＣａｓ１タンパク質は、ｃｃｄＢの発現をノックダウンした（図１７Ｂ、Ｅｓ＿ｎＣａｓ１；ｕｎｃｕｌ＿ｎＣａｓ１）。転写開始部位の下流のＤＮＡ配列の結合を介したｄＣａｓ９（触媒的に不活性な、すなわち「死んだ」Ｃａｓ９）媒介性転写抑制は、当該分野での現在の標準であるので、本発明者らは、ｄＣａｓ９をｃｃｄＢプロモーターに標的化して、ｃｃｄＢ遺伝子の転写を抑制することによって、アッセイを検証する。合わせると、このデータは、ＨＥＰＮドメイン依存的様式での、原核生物細胞内でｉｎ　ｖｉｖｏでの標的転写物のガイドＲＮＡ特異的分解を実証している。

【０２９７】

（実施例１９）

Ｃａｓ１３ｄオルソログは、ヒト細胞における発現を減少させる

５０個の異なるＣａｓ１３ｄオルソログ（その一部は、ＮＬＳタグＳＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳ　配列番号２５６およびＧＰＫＫＫＲＫＶＡＡＡ　配列番号２５、または２つのＨＩＶ　ＮＥＳ配列（ＬＱＬＰＰＬＥＲＬＴＬ、配列番号２８７）を含んだ、表１を参照のこと）を、２９３細胞においてｍＣｈｅｒｒｙまたは内因性ＣＤ８１発現を減少させるそれらの能力について試験した。

【０２９８】

細胞培養

ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）細胞系２９３ＦＴ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を、１０％ＦＢＳ（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）および１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを補充したＤＭＥＭ（４．５ｇ／Ｌグルコース）中で、３７℃で５％CO_2で維持した。８０～９

０％コンフルエンシーに達したところで、細胞を、ＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して解離させ、１：２の比で継代した。

【０２９９】

ヒト細胞系の一過的トランスフェクション

Ｃａｓ１３ｄオルソログを、２つのＨＩＶ　ＮＥＳ配列（配列番号２８７）または２つのＳＶ４０　ＮＬＳ配列（ＳＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳ、配列番号２５６およびＧＰＫＫＫＲＫＶＡＡＡ、配列番号２５）のいずれか、およびＴ２Ａ連結されたＥＧＦＰが隣接する共通の発現骨格中にクローニングした。ＣＤ８１を標的にするスペーサーを、２つのスペーサーのアレイがＵ６プロモーターによって駆動されるガイド発現構築物中にクローニングした。

【０３００】

一過的トランスフェクションの前に、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を、９６ウェルプレート中に１ウェル当たり２０，０００細胞の密度でプレートし、製造業者のプロトコールに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、＞９０％コンフルエンスにおいて、２００ｎｇのＣａｓ１３発現プラスミドおよび２００ｎｇのｇＲＮＡ発現プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、フローサイトメトリーのために、トランスフェクションの７２時間後に収集した。

【０３０１】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーによる分析の前に、２９３ＦＴ細胞を、ＦＡＣＳ緩衝液（１×ＤＰＢＳ－／－、０．２％ＢＳＡ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ）中で室温で１０分間、Ｈｕｍａｎ　Ｔｒｕｓｔａｉｎ　ＦｃＸ　Ｂｌｏｃｋｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）でブロッキングした。次いで、細胞を、氷上でα－ＣＤ８１－ＡＰＣ（２９３ＦＴ　Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃについて１：４００）またはＲＥＡ２９３（Ｓ）Ｉｓｏｔｙｐｅ　Ｃｏｎｔｒｏｌ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）抗体で１５分間染色した。フローサイトメトリーを、ＭＡＣＳＱｕａｎｔ　ＶＹＢ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して９６ウェルプレートフォーマットで実施し、ＦｌｏｗＪｏ　１０を使用して分析した。

【０３０２】

表１に示されるように、いくつかのオルソログは、顕著なノックダウン活性（すなわち、ノックダウン効率についてより低い値）を有した。表１において、（ｔｒｕｎｃ）は、保存されていないＮ末端の短縮を有するオルソログのバージョンを示す。ＮＥＳは、二重ＨＩＶ　ＮＥＳ融合（配列番号２８７）を有するオルソログを示し、ＮＬＳは、二重ＳＶ４０　ＮＬＳ融合（配列番号２５６および２５）を有するオルソログを示す。

【表１－１】

表1:ヒト細胞におけるCas13dオルソログのmCherry活性スクリーニング

オルソログ	ノックダウン効率	標準偏差	配列番号
Ga7274-NLS	12.7	1.0	198
Rfx-NLS	18.6	2.6	280
Ur(trunc)-NLS	19.0	1.2	3
twins_985-NES	20.7	1.3	212
Ga_0531-NES	22.3	2.8	235
Ga_0531-NLS	22.6	0.5	235
k87-NES	24.7	3.1	189
twins_985-NLS	26.4	1.8	212

【表１－２】

Ur(trunc)-NES	27.7	1.0	3
stool_9834-NLS	29.0	2.4	208
OGPN-NES	32.6	1.9	164
Ur-NLS	33.9	0.7	3
OGZC-NES	34.7	1.7	155
Ga_9260-NLS	36.5	6.6	237
NFIR-NLS	36.7	1.5	166
Ga_9260-NES	38.3	2.9	237
DJXD-NLS	39.2	3.0	153
OGZC-trunc	40.3	1.1	155
k87-NLS	41.1	4.6	189
PIG_6364-NLS	41.2	6.3	243
twins_300-NLS	42.8	5.9	210
DLF_1914-NES	44.5	10.5	224
BMZ_7771-NLS	46.4	5.9	218
PIG_3397-NES	46.9	3.2	245
Ga7274-NES	47.7	3.6	198
PIG_5479-NES	49.1	3.6	249
OCTW-NLS	50.1	10.8	183
PIG_6364-NES	50.3	2.1	243
Piggy-NES	51.6	5.4	170
OGNF-NLS	52.3	3.2	185
Ga_8792-NES	52.9	1.9	206
OJMM-NES	53.1	1.5	175
OGDF-NLS	53.6	3.4	162
GL_3589-NLS	53.7	3.5	216
Ga_5336-NLS	53.7	0.6	233
OGDF-NES	54.6	1.4	162
BMZ_7915-NES	55.7	8.0	220
OCTW-NES	55.9	10.8	183
OBVH-NLS	56.5	5.2	147
Ga8792-NLS	59.0	8.8	206
OJMM-NLS	59.1	1.6	175
BMZ_7915-NLS	59.9	9.7	220
BMZ_7771-NES	59.9	4.6	218
Rfx-NES	60.5	7.7	92

【表１－３】

Ga_4192	62.2	5.8	229
twins_300-NES	62.4	8.4	210
DJXD-NES	63.5	8.2	153
Ga_8067-NES	63.7	10.9	204
PIG_5479-NLS	64.4	20.8	249
Ga0735-NLS	65.2	12.4	202
OGPN-NLS	66.2	6.4	164
Piggy-NLS	66.3	8.0	147
MH_4866-NLS	67.1	4.1	292
OIEN-NES	67.8	16.6	187
Ga_4192-NLS	68.7	2.2	229
Ga_0735-NES	69.2	12.0	202
OHCP-NLS	69.2	4.1	160
OIEN-NLS	69.6	7.2	187
DBYI-NLS	70.5	13.7	149
Ga5759-trunc	71.2	15.2	251
DBYI-NES	71.5	7.1	149
stool_9834-NES	72.6	3.9	208
Ga_6931-NLS	73.4	5.2	231
MH_4866-NES	76.6	3.1	292
O2UC_6317-NES	79.2	2.7	241
OGNF-NES	80.2	10.2	185
Ga_6931-NES	83.3	15.9	231
OCVV-NES	84.8	14.7	181
O2UC_6317-NLS	86.2	6.6	241
ODAI_557-NES	86.5	14.4	
Ga5759-NLS	91.1	10.3	251
ODAI1274-NLS	92.0	9.0	177
Ga_5336-NES	93.5	2.8	233
OCVV-NLS	93.5	5.6	181
GL_3589-NES	95.4	3.5	216
PIG_9734-NLS	97.1	10.6	247
EMG3641-NES	105.8	7.6	200
GL_4153-NLS	106.7	5.3	214
BMZ_9617-NES	110.0	7.8	222
EMG3641-NLS	112.6	11.3	200

【表１－４】

Ga8067-NLS	111.4	16.1	204

【０３０３】

表１中のデータを、相対的ｍＣｈｅｒｒｙ発現（ノックダウン効率）対オルソログのサイズとしてプロットし、ＣａｓＲｘ（配列番号２８０）と比較した。図１９Ａに示されるように、３つのオルソログ（Ｇａ０５３１－ＮＬＳ、ｋ８７－ＮＥＳおよびＧａ７２７４－ＮＬＳ、それぞれ、配列番号２３５、１８９および１９８）は、ＣａｓＲｘバリアント（配列番号２８０）と匹敵する活性を示す。

【０３０４】

表１および図１９Ａに示される２５個の最も活性なオルソログを、ＨＥＫ２９３細胞における内因性遺伝子ＣＤ８１の発現を減少させるそれらの能力について試験した。図１９Ｂに示されるように、ＣａｓＲｘバリアントＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ（配列番号２８０）は、最も高いレベルのノックダウンを示し、いくつかのさらなるオルソログは、この内因性標的に対して＞７５％のノックダウンを示した。

【０３０５】

＞７０％のノックダウンを示す５つのオルソログの分析により、以下のコンセンサスモチーフが、低い活性（＜５０％のノックダウン）を有するＣａｓ１３ｄオルソログと比較して、ヒト細胞において高い活性を有するＣａｓ１３ｄオルソログにおいて、より高い頻度で存在することが示された。したがって、かかるコンセンサスモチーフを有するＣａｓ１３ｄタンパク質（例えば、配列番号２８８、２８９、２９０または２９１を含むタンパク質配列、ならびにそれらをコードする核酸、かかる核酸をコードするベクター、およびかかるタンパク質／核酸を使用する方法）が、本明細書で提供される：

【化６】

1. L-[DE]-G-K-E-I-N-x-[LM]-x-[CST]-[ANST]-L-I-x-K-F-[DE]-[GN]-I-x-[ADS]-[FIL]-x-[DEHK]-[AILV] (配列番号 288)
2. R-N-[FY]-I-[AIL]-x-N-V-[ILV]-x-[NS]-x(2)-F-x-Y-[ILV]-[AIV]-[KR]-[HY]-x(2)-[PT]-x(3)-[HKR]-x-[IL]-x(2)-N-x(2)-[ILV]-x(2)-[FY]-V-L-x(2)-[ILM]-[AGP]-[DE]-x(4)-[NQRS] (配列番号 289)
3. L-x-[LM]-[ST]-[IV]-x-Y-x(3)-K-[NS]-[ILM]-V-x-[IV]-N-[AST]-R-[FY]-x(2)-[AG]-[FY]-x-[ACV]-[LV]-E-R-D-x(2)-[FL] (配列番号 290)
4. P-F-[AGS]-Y-[CNV]-x-[AP]-R-[FY]-K-N-L-[ST]-x-[EN]-x-L-F-x-[DKR]-[DEN] (配列番号 291)

【０３０６】

（実施例２０）

ＣａｓＲｘのＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＮＥＳに対するノックダウン活性の比較

ＣａｓＲｘ（ＲｆｘＣａｓ１３ｄ－ＮＬＳ設計；配列番号２８０）が２９３ＦＴ細胞において内因性ＣＤ８１タンパク質発現をノックダウンする能力を、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＮＥＳと比較した（Cox et al., Science. 2017 Nov 24;358(6366):1019-1027を参照のこと）。２９３ＦＴ細胞を培養し、一過的にトランスフェクトし、３日後、ＣＤ８１発現を、実施例１９に記載されるように、フローサイトメトリーを使用して検出した。

【０３０７】

図２０に示されるように、ＣａｓＲｘ（配列番号２８０）は、等価なタンパク質レベルにおいて顕著により高い活性を示し（Ｃａｓ１３－ＧＦＰ発現によって測定される）、これは、酵素１単位当たりのより高い活性、したがって、生物学的／治療的に適切なレベルのノックダウンに達するための、より低い必要用量を示している。さらに、ＣａｓＲｘは、ＰｓｐＣａｓ１３ｂよりも顕著に小さい。小さいサイズ、および低い容量での高い活性

は、ＣａｓＲｘを、治療的送達にとって有用なものにする。

【０３０８】

（実施例２１）

Ｃａｓ１３ｄオルソログに対する欠失の効果

Ｃａｓ１３ｄオルソログに対する欠失の効果を、以下のように試験した。簡潔に述べると、アミノ酸（ａａ）欠失を、２つの異なるＣａｓ１３ｄオルソログＧａ－５３１（配列番号２３５）およびＲｆｘＣａｓ１３ｄ（配列番号２８０）中に操作した。アミノ酸欠失を、Ｎ末端、Ｃ末端または内部において行った。短縮のための領域は、Ｃａｓ１３ｄオルソログ間でのそれらの低い保存に基づいて選択した（例えば、図１８Ａ～１８ＭＭＭを参照のこと）。最大５０ａａの欠失を、単一のタンパク質において行った。得られたタンパク質配列を、表２に示す。

【表２－１】

表2: Cas13d突然変異(**太字**=NLS/NESタグ、<u>下線</u>=挿入されたリンカー配列;*イタリック*=隣接配列)

エフェクター	配列 (配列番号)	説明
NLS-Ga_0531(trunc)-NLS-HA	MS**PKKKRK***VEASKQSKK*TFAKASGLKST LAVDNSAVMTVFGRGNEAKLDHRINAD LQSESLHPQAALKNVHAPNKQKIHFIGR MQDMNLTADHPLHSHDGERAVGADLL CAKDKLEQLYFGRTFNDNIHIQLIYQILD IQKILALHANNIIFALDNLLHKKNDELSD DFVGMGRMRATIGYDAFRNSTNQKVQE TYREFQEFVRRKELLYFGSAFYNGDTRR DEKVIYHILSLAASVRQFCFHNDYTSDD GKGFIKADWMYRLEEALPAEYKDTLDA LYLEGVEGLDQSFLKNNTVNIQILCSIFN HDDPNKIAEEYYGFLMTKEYKNMGFSIK KLRECMLELPELSGYKEDQYNSVRSKLY KLFDFIIAHYFRKHPEKGEEMVDCLRLC MTEDEKDSHYEGTAKKLVRELAYDMQ EAAEQANGSNITQMQKNEQQGKTKGMF AIRDEIRVSRKPVSYFSKVIYVMTLLLDG KEINDLLTTLINKFENIVSFEDVLRQLNV DCTFKPEFAFFGYDRCRNISGELRLINSF ARMQKPSAKAKHVMYRDALRILGLDN GMSEEALDQEVRRILQIGADGKPIKNAN KGFRNFIASNVIESSRFRYLVRYNNPHKT RMIAQNEAIVRFVLSEIPDEQIRRYYDVC RDPKLPRSSSREAQVDILTGIITDVNYRIF EDVPQSKKINKDRPDANDRMTLKKQRY QAIVSLYLTVMYLVTKNLVYVVNSRYVM AFHALERDAYLYGITNIKGDYRKLTDNL LADENYKKFGHFKNKKWRGIAEQNLRN SDVPVIKSFRNMAAHISVIRNIDLYIGDIQ KVDSYFALYHFLMQKLIQRVVPENTKG LSDQTKKYYDALEQYNTYCKDFVKAYC TPFAYVTPRYKNLTIDGLFDRNRPGEDK GSG**PKKKRKV**AAAYPYDVPDYA (配列番号 278)	N末端欠失
NES-Ga_0531(tr	ML**QLPPLERL***TLGSGKQSKK*TFAKASGL KSTLAVDNSAVMTVFGRGNEAKLDHRI	N末端欠失

【表２－２】

unc)-NES-HA	NADLQSESLHPQAALKNVHAPNKQKIHF IGRMQDMNLTADHPLHSHDGERAVGAD LLCAKDKLEQLYFGRTFNDNIHIQLIYQI LDIQKILALHANNIIFALDNLLHKKNDEL SDDFVGMGRMRATIGYDAFRNSTNQKV QETYREFQEFVRRKELLYFGSAFYNGDT RRDEKVIYHILSLAASVRQFCFHNDYTS DDGKGFIKADWMYRLEEALPAEYKDTL DALYLEGVEGLDQSFLKNNTVNIQILCSI FNHDDPNKIAEEYYGFLMTKEYKNMGF SIKKLRECMLELPELSGYKEDQYNSVRS KLYKLFDFIIAHYFRKHPEKGEEMVDCL RLCMTEDEKDSHYEGTAKKLVRELAYD MQEAAEQANGSNITQMQKNEQQGKTK GMFAIRDEIRVSRKPVSYFSKVIYVMTLL LDGKEINDLLTTLINKFENIVSFEDVLRQ LNVDCTFKPEFAFFGYDRCRNISGELRLI NSFARMQKPSAKAKHVMYRDALRILGL DNGMSEEALDQEVRRILQIGADGKPIKN ANKGFRNFIASNVIESSRFRYLVRYNNPH KTRMIAQNEAIVRFVLSEIPDEQIRRYYD VCRDPKLPRSSSREAQVDILTGIITDVNY RIFEDVPQSKKINKDRPDANDRMTLKKQ RYQAIVSLYLTVMYLVTKNLVYVNSRY VMAFHALERDAYLYGITNIKGDYRKLT DNLLADENYKKFGHFKNKKWRGIAEQN LRNSDVPVIKSFRNMAAHISVIRNIDLYI GDIQKVDSYFALYHFLMQKLIQRVVPEN TKGLSDQTKKYYDALEQYNTYCKDFVK AYCTPFAYVTPRYKNLTIDGLFDRNRPG EDKGSGLQLPPLERLTLYPYDVPDYA (　配列番号　279)	
NLS-RfxCas13d-NLS-HA	MSPKKKRKVEASIEKKKSFAKGMGVKS TLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGD SIRSVNEGEAFSAEMADKNAGYKIGNAK FSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGL KETLEKRYFGESADGNDNICIQVIHNILD IEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFG KFSTVYTYDEFKDPEHHRAAFNNNDKLI NAIKAQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFS KEGRNYIINYGNECYDILALLSGLRHWV VHNNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYIS TLNYLYDRITNELTNSFSKNSAANVNYI AETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGF NITKLREVMLDRKDMSEIRKNHKVFDSI RTKVYTMMDFVIYRYYIEEDAKVAAAN KSLPDNEKSLSEKDIFVINLRGSFNDDQK DALYYDEANRIWRKLENIMHNIKEFRGN KTREYKKKDAPRLPRILPAGRDVSAFSK LMYALTMFLDGKEINDLLTTLINKFDNI QSFLKVMPLIGVNAKFVEEYAFFKDSAK IADELRLIKSFARMGEPIADARRAMYIDA IRILGTNLSYDELKALADTFSLDENGNKL KKGKHGMRNFIINNVISNKRFHYLIRYG DPAHLHEIAKNEAVVKFVLGRIADIQKK QGQNGKNQIDRYYETCIGKDKGKSVSE	欠失なし

【表２－３】

	KVDALTKIITGMNYDQFDKKRSVIEDTG RENAEREKFKKIISLYLTVIYHILKNIVNI NARYVIGFHCVERDAQLYKEKGYDINL KKLEEKGFSSVTKLCAGIDETAPDKRKD VEKEMAERAKESIDSLESANPKLYANYI KYSDEKKAEEFTRQINREKAKTALNAYL RNTKWNVIIREDLLRIDNKTCTLFRNKA VHLEVARYVHAYINDIAEVNSYFQLYH YIMQRIIMNERYEKSSGKVSEYFDAVND EKKYNDRLLKLLCVPFGYCIPRFKNLSIE ALFDRNEAAKFDKEKKKVSGNSGSGP**K KKRK**VAAAYPYDVPDYA（配列番号 280）	
NLS- RfxCas13d (del5)- NLS-HA	MS**PKKKRK**VEASIEKKKSFAKGMGVKS TLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGD SIRSVNEGEAFSAEMADKNAGYKIGNAK FSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGL KETLEKRYFGESADGNDNICIQVIHNILD IEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFG KFSTVYTYDEFKDPEHHRAAFNNNDKLI NAIKAQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFS KEGRNYIINYGNECYDILALLSGLRHWV VHNNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYIS TLNYLYDRITNELTNSFSKNSAANVNYI AETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGF NITKLREVMLDRKDMSEIRKNHKVFDSI RTKVYTMMDFVIYRYYIEEDAKVAAAN KSLPDNEKSLSEKDIFVINLRGSFNDDQK DALYYDEANRIWRKLENIMHNIKEFRGN KTREYKKKDAPRLPRILPAGRDVSAFSK LMYALTMFLDGKEINDLLTTLINKFDNI QSFLKVMPLIGVNAKFVEEYAFFKDSAK IADELRLIKSFARMGEPIADARRAMYIDA *IRILG*GGGGSGGGGS*MRNFI*INNVISNKRF HYLIRYGDPAHLHEIAKNEAVVKFVLGR IADIQKKQGQNGKNQIDRYYETCIGKDK GKSVSEKVDALTKIITGMNYDQFDKKRS VIEDTGRENAEREKFKKIISLYLTVIYHIL KNIVNINARYVIGFHCVERDAQLYKEKG YDINLKKLEEKGFSSVTKLCAGIDETAPD KRKDVEKEMAERAKESIDSLESANPKLY ANYIKYSDEKKAEEFTRQINREKAKTAL NAYLRNTKWNVIIREDLLRIDNKTCTLF RNKAVHLEVARYVHAYINDIAEVNSYF QLYHYIMQRIIMNERYEKSSGKVSEYFD AVNDEKKYNDRLLKLLCVPFGYCIPRFK NLSIEALFDRNEAAKFDKEKKKVSGNSG SG**PKKKRK**VAAAYPYDVPDYA （配列番号 281）	アミノ酸558～587が欠失
NLS- RfxCas13d (del5.12)- NLS-HA	MS**PKKKRK**VEASIEKKKSFAKGMGVKS TLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGD SIRSVNEGEAFSAEMADKNAGYKIGNAK FSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGL KETLEKRYFGESADGNDNICIQVIHNILD IEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFG KFSTVYTYDEFKDPEHHRAAFNNNDKLI	アミノ酸558～587および953～966が欠失

【表２－４】

	NAIKAQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFS KEGRNYIINYGNECYDILALLSGLRHWV VHNNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYIS TLNYLYDRITNELTNSFSKNSAANVNYI AETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGF NITKLREVMLDRKDMSEIRKNHKVFDSI RTKVYTMMDFVIYRYYIEEDAKVAAAN KSLPDNEKSLSEKDIFVINLRGSFNDDQK DALYYDEANRIWRKLENIMHNIKEFRGN KTREYKKKDAPRLPRILPAGRDVSAFSK LMYALTMFLDGKEINDLLTTLINKFDNI QSFLKVMPLIGVNAKFVEEYAFFKDSAK IADELRLIKSFARMGEPIADARRAMYIDA *IRILG*GGGGSGGGGS*MRNFI*INNVISNKRF HYLIRYGDPAHLHEIAKNEAVVKFVLGR IADIQKKQGQNGKNQIDRYYETCIGKDK GKSVSEKVDALTKIITGMNYDQFDKKRS VIEDTGRENAEREKFKKIISLYLTVIYHIL KNIVNINARYVIGFHCVERDAQLYKEKG YDINLKKLEEKGFSSVTKLCAGIDETAPD KRKDVEKEMAERAKESIDSLESANPKLY ANYIKYSDEKKAEEFTRQINREKAKTAL NAYLRNTKWNVIIREDLLRIDNKTCTLF RNKAVHLEVARYVHAYINDIAEVNSYF QLYHYIMQRIIMNERYEKSSGKVSEYFD AVNDEKKYNDRLLKLLCVPFGYCIPRFK NLSIEAL*FDRNEGSGPK***KKRKV**AAAYPY DVPDYA (　配列番号　282)	
NLS- RfxCas13d (del5.13)- NLS-HA	MS**PKKKRKV**EASIEKKKSFAKGMGVKS TLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGD SIRSVNEGEAFSAEMADKNAGYKIGNAK FSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGL KETLEKRYFGESADGNDNICIQVIHNILD IEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFG KFSTVYTYDEFKDPEHHRAAFNNNDKLI NAIKAQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFS KEGRNYIINYGNECYDILALLSGLRHWV VHNNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYIS TLNYLYDRITNELTNSFSKNSAANVNYI AETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGF NITKLREVMLDRKDMSEIRKNHKVFDSI RTKVYTMMDFVIYRY*YIEEDSEKDI*FVIN LRGSFNDDQKDALYYDEANRIWRKLEN IMHNIKEFRGNKTREYKKKDAPRLPRILP AGRDVSAFSKLMYALTMFLDGKEINDL LTTLINKFDNIQSFLKVMPLIGVNAKFVE EYAFFKDSAKIADELRLIKSFARMGEPIA DARRAMYIDA*IRILG*GGGGSGGGGS*MRN FI*INNVISNKRFHYLIRYGDPAHLHEIAK NEAVVKFVLGRIADIQKKQGQNGKNQI DRYYETCIGKDKGKSVSEKVDALTKIIT GMNYDQFDKKRSVIEDTGRENAEREKF KKIISLYLTVIYHILKNIVNINARYVIGFH CVERDAQLYKEKGYDINLKKLEEKGFSS VTKLCAGIDETAPDKRKDVEKEMAERA KESIDSLESANPKLYANYIKYSDEKKAEE	アミノ酸376～392および558～587が欠失

【表２－５】

	FTRQINREKAKTALNAYLRNTKWNVIIR EDLLRIDNKTCTLFRNKAVHLEVARYVH AYINDIAEVNSYFQLYHYIMQRIIMNERY EKSSGKVSEYFDAVNDEKKYNDRLLKL LCVPFGYCIPRFKNLSIEALFDRNEAAKF DKEKKKVSGNSGSG**PKKKRKV**AAAYP YDVPDYA (配列番号 283)	
NLS- RfxCas13d (del5.12+5. 13)-NLS- HA	MS**PKKKRKV**EASIEKKKSFAKGMGVKS TLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGD SIRSVNEGEAFSAEMADKNAGYKIGNAK FSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGL KETLEKRYFGESADGNDNICIQVIHNILD IEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFG KFSTVYTYDEFKDPEHHRAAFNNNDKLI NAIKAQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFS KEGRNYIINYGNECYDILALLSGLRHWV VHNNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYIS TLNYLYDRITNELTNSFSKNSAANVNYI AETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGF NITKLREVMLDRKDMSEIRKNHKVFDSI RTKVYTMMDFVIYRY*YIEEDSEKDIF*VIN LRGSFNDDQKDALYYDEANRIWRKLEN IMHNIKEFRGNKTREYKKKDAPRLPRILP AGRDVSAFSKLMYALTMFLDGKEINDL LTTLINKFDNIQSFLKVMPLIGVNAKFVE EYAFFKDSAKIADELRLIKSFARMGEPIA DARRAMYIDA*IRILG*GGGGSGGGGS*MRN FI*INNVISNKRFHYLIRYGDPAHLHEIAK NEAVVKFVLGRIADIQKKQGQNGKNQI DRYYETCIGKDKGKSVSEKVDALTKIIT GMNYDQFDKKRSVIEDTGRENAEREKF KKIISLYLTVIYHILKNIVNINARYVIGFH CVERDAQLYKEKGYDINLKKLEEKGFSS VTKLCAGIDETAPDKRKDVEKEMAERA KESIDSLESANPKLYANYIKYSDEKKAEE FTRQINREKAKTALNAYLRNTKWNVIIR EDLLRIDNKTCTLFRNKAVHLEVARYVH AYINDIAEVNSYFQLYHYIMQRIIMNERY EKSSGKVSEYFDAVNDEKKYNDRLLKL LCVPFGYCIPRFKNLSIEAL*FDRNEGSGP* ***K*KKRKV**AAAYPYDVPDYA (配列番号 284)	アミノ酸376～392、558～587および953～966が欠失
NLS- RfxCas13d (del13)- NLS-HA	MS**PKKKRKV**EASIEKKKSFAKGMGVKS TLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGD SIRSVNEGEAFSAEMADKNAGYKIGNAK FSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGL KETLEKRYFGESADGNDNICIQVIHNILD IEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFG KFSTVYTYDEFKDPEHHRAAFNNNDKLI NAIKAQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFS KEGRNYIINYGNECYDILALLSGLRHWV VHNNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYIS TLNYLYDRITNELTNSFSKNSAANVNYI AETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGF NITKLREVMLDRKDMSEIRKNHKVFDSI RTKVYTMMDFVIYRY*YIEEDSEKDIF*VIN	アミノ酸376～392が欠失

【表２－６】

	LRGSFNDDQKDALYYDEANRIWRKLEN IMHNIKEFRGNKTREYKKKDAPRLPRILP AGRDVSAFSKLMYALTMFLDGKEINDL LTTLINKFDNIQSFLKVMPLIGVNAKFVE EYAFFKDSAKIADELRLIKSFARMGEPIA DARRAMYIDAIRILGTNLSYDELKALAD TFSLDENGNKLKKGKHGMRNFIINNVIS NKRFHYLIRYGDPAHLHEIAKNEAVVKF VLGRIADIQKKQGQNGKNQIDRYYETCI GKDKGKSVSEKVDALTKIITGMNYDQF DKKRSVIEDTGRENAEREKFKKIISLYLT VIYHILKNIVNINARYVIGFHCVERDAQL YKEKGYDINLKKLEEKGFSSVTKLCAGI DETAPDKRKDVEKEMAERAKESIDSLES ANPKLYANYIKYSDEKKAEEFTRQINRE KAKTALNAYLRNTKWNVIIREDLLRIDN KTCTLFRNKAVHLEVARYVHAYINDIAE VNSYFQLYHYIMQRIIMNERYEKSSGKV SEYFDAVNDEKKYNDRLLKLLCVPFGY CIPRFKNLSIEALFDRNEAAKFDKEKKK VSGNSGSG**PKKKRK**VAAAYPYDVPDY A（　配列番号　285）	

【０３０９】

２９３ＦＴ細胞を培養し、一過的にトランスフェクトし、３日後、ＣＤ８１発現を、実施例１９に記載されるように、フローサイトメトリーを使用して検出した。

【０３１０】

図２１に示されるように、Ｃａｓ１３ｄオルソログである、低保存された領域中に欠失を含有するＣａｓＲｘおよびＧａ０５３１は、ヒトＨＥＫ２９３ＦＴ細胞においてノックダウン活性を維持する。これらの結果に基づいて、類似の欠失が、本明細書で提供される配列アライメントを使用して、本明細書で提供される他のＣａｓ１３ｄオルソログに対して行われ得る。

【０３１１】

（実施例２２）

ｄＣａｓ１３ｄ媒介性スプライシング

高レベルのタンパク質ノックダウンを示した（実施例１９～２０を参照のこと）いくつかのＣａｓ１３ｄオルソログ（ネイティブおよび短縮型バリアント、実施例２１を参照のこと）がスプライシングを指示する能力を、以下のように試験した。Ｃａｓ１３ｄオルソログ（標的ＲＮＡ切断を消失させる、突然変異したＨＥＰＮドメインを有する）は、二色の青対赤のスプライスレポーターのスプライスアクセプター部位に標的化されて、エクソン排除（ｍＴａｇＢＦＰ２発現における低減によって測定される）を媒介した。２９３ＦＴ細胞を培養し、一過的にトランスフェクトし、３日後、ＣＤ８１発現を、実施例１９に記載されるように、フローサイトメトリーを使用して検出した。

【０３１２】

図２２に示されるように、高レベルの内因性タンパク質ノックダウン（＞７０％のＣＤ８１タンパク質ノックダウン）を有するオルソログについてさえ、スプライシングモジュレーションは、一部の場合には非効率的であった。しかし、ｄＣａｓＲｘ（配列番号２８０）、ｄＣａｓＲｘ－ｄｅｌ１３（配列番号２８５）およびｄＧａ７２７４（配列番号１９８）は全て、良好なスプライシング活性を示した。これら３つの配列は、比較的密接に関連しており、＞７０％の配列同一性を共有する。したがって、Ｃａｓ１３ｄオルソログ、例えばＣａｓＲｘ、および短縮型ＣａｓＲｘバリアント、例えばＣａｓＲｘ－ｄｅｌ１３は、スプライシングをモジュレートするために使用され得る。

【０３１３】
（実施例２３）
Ｃａｓ１３ｄを使用するＲＮＡ編集
この実施例は、ヒト細胞においてＲＮＡ発現を編集するためのＣａｓ１３ｄの使用を記載する。
【０３１４】
細胞培養
ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）細胞系２９３ＦＴ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を、１０％ＦＢＳ（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）および１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを補充したＤＭＥＭ（４．５ｇ／Ｌグルコース）中で、３７℃で５％CO_2で維持した。８０～９０％コンフルエンシーに達したところで、細胞を、ＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して解離させ、１：２の比で継代した。
【０３１５】
ｄＣａｓ１３ｄ－ＡＤＡＲ哺乳動物発現構築物のクローニング
図２３Ａに示されるように、ｄＣａｓ１３ｂおよびｄＣａｓ１３ｄコード配列を、ＡＤＡＲ2_{DD}（Ｔ３７５Ｇ）へのＮ末端またはＣ末端融合、ならびにＣ末端ＮＬＳまたはＮＥＳ配列（例えば、配列番号２８６を参照のこと）と共に、哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ融合物によるＡからＩへのＲＮＡ編集を評価するために使用したＥＧＦＰレポーターは、トリプトファン５７において成熟前停止コドン（ＵＡＧ）を含有するように操作し（Ｗ５７Ｘ）、Ｐ２ＡペプチドリンカーによってｍＣｈｅｒｒｙに連結させた。このＥＧＦＰレポーターを標的にするガイドを、可変性のスペーサー長、およびダイレクトリピート配列（ＲｆｘＣａｓ１３ｄについては５’、ＰｓｐＣａｓ１３ｂについては３’）から規定された距離離れたＡ－Ｃミスマッチを用いて設計した。
【０３１６】
ヒト細胞系の一過的トランスフェクション
一過的トランスフェクションの前に、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を、９６ウェルプレート中に１ウェル当たり２０，０００細胞の密度でプレートし、製造業者のプロトコールに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、＞９０％のコンフルエンスにおいて、４０ｎｇのＥＧＦＰ（Ｗ５７Ｘ）レポータープラスミドおよびガイド発現ベクターに対する変動するモル比のｄＣａｓ１３ｄ－ＡＤＡＲベクターと共に、５００ｎｇの総プラスミドＤＮＡを、トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、フローサイトメトリーのために、トランスフェクションの４８時間後に収集した。
【０３１７】
フローサイトメトリー
細胞を、トランスフェクションの４８時間後にＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓで解離させ、ＦＡＣＳ緩衝液（１×ＤＰＢＳ$^{-/-}$、０．２％ＢＳＡ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ）中に再懸濁した。フローサイトメトリーを、ＭＡＣＳＱｕａｎｔ　ＶＹＢ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して９６ウェルプレートフォーマットで実施し、ＦｌｏｗＪｏ　１０を使用して分析した。分析は、ＢＦＰ$^{+}$（ｄＣａｓ１３ｄ－ＡＤＡＲ－Ｐ２Ａ－ｍＴａｇＢＦＰ２を発現している）およびｍＣｈｅｒｒｙ$^{+}$（ｍＣｈｅｒｒｙ－Ｐ２Ａ－ＥＧＦＰ（Ｗ４７Ｘ）を発現している）集団を示し、これらを、ベースラインを上回ってＥＧＦＰを発現している細胞の％を観察することによって、ＲＮＡ編集について評価した。
【０３１８】
図２３Ｂに示されるように、ＧＦＰレポーターにおける、成熟前停止コドンの、Ｃａｓ１３ｄを使用する標的化されたＡからＩへのＲＮＡ編集は、ＧＦＰ発現を再活性化するが、非標的化ガイドは、ＲＮＡ編集を生じなかった。図２３Ｃは、細胞中にトランスフェクトされたｄＣａｓ１３ｄ－ＡＤＡＲベクターの量に基づいた、Ｃａｓ１３ｄ媒介性ＲＮＡ編集効率の定量を提供する。

【０３１９】
（実施例２４）
アンチセンスオリゴヌクレオチドのＣａｓ１３媒介性識別
有効なアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）結合性部位の発見は、遺伝子コード化の欠如、ＡＳＯ生成の労力を要する性質、および化学的改変の頻繁な必要に起因して、低スループットで高価なプロセスであり得る。Ｃａｓ１３酵素およびそのバリアント、例えば、本明細書で開示されるＣａｓ１３ｄタンパク質およびバリアントは、ＡＳＯ結合性部位の識別を単純化および加速するために使用され得るが、それは、触媒的に活性なまたは不活性なＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３の結合が、ＡＳＯ媒介性のＲＮＡ切断および／または結合の効果を模倣することができるからである。

【０３２０】
一例では、Ｃａｓ１３ガイドＲＮＡのライブラリーは、例えば、ウェル毎の、またはプールされたオリゴヌクレオチドのフォーマットで生成され、所望のＲＮＡの特異的シス－エレメントを標的にするために設計される（例えば、有効かつ部位アクセス可能なＡＳＯ結合性部位を識別するために、治療的に重要なタンパク質、例えば、ジストロフィンまたはＳＭＮ１／ＳＭＮ２のプレｍＲＮＡのイントロン、またはＵＴＲまたは遺伝子本体内の所望の位置をタイリングする）。この方法は、ＡＳＯリード発見、ｉｎ　ｖｉｖｏ　ＲＮＡ二次構造の照合、および公知のまたは新規のスプライシング調節エレメントの識別に利用され得る。

【０３２１】
（実施例２５）
Ｃａｓ１３を用いて翻訳を増加させる
本明細書で開示されるＣａｓ１３ｄ酵素およびバリアントは、転写後調節プロセスの標的化された操作によって、標的タンパク質の翻訳を増加させるために使用され得る。上流オープンリーディングフレーム（ｕＯＲＦ）のＣａｓ１３ｄ媒介性阻害（例えば、立体遮断または他の機構を介した）は、この操作を達成するために使用され得る。例えば、本明細書で開示されるＣａｓ１３ｄ酵素およびバリアントを使用するＣａｓ１３ｄ媒介性阻害は、ヒトまたは哺乳動物遺伝子の翻訳のための代替的開始部位、または標的遺伝子のＵＴＲ内の翻訳阻害性モチーフおよびエレメントとして機能し得る。ｕＯＲＦを阻害することによって、減少したリボソーム競合および他の機構が、カノニカルまたは所望の開始コドンからの標的遺伝子の翻訳を増加させ得る。ヒト転写物のほぼ半分がｕＯＲＦを示し（Barbosa et al., Plos Genetics 9:e1003529, 2013）、これが、タンパク質発現の広範な低減を引き起こし得る。同様に、５’ＵＴＲ内の阻害性エレメント、例えば、二次構造またはＧ－四重鎖を不活性化することによって、翻訳が増加され得る。

【０３２２】
これは、ガイドＲＮＡを使用して、翻訳阻害を増加させ得るエフェクタータンパク質（例えば、Ｐｄｃｄ４のＣ末端ドメインＭＡ３ドメイン）に、ｕＯＲＦまたは翻訳阻害性エレメントに、必要に応じて融合させたＣａｓ１３ｄエフェクターを標的にすることによって達成され得る。前記ガイドＲＮＡは、複数のガイドＲＮＡまたはプレｇＲＮＡアレイのいずれかを介して、多重化様式でも送達され得る。かかる方法は、治療的またはバイオテクノロジー的に有用なタンパク質、例えば、家族性高コレステロール血症におけるＬＤＬＲ、嚢胞性線維症におけるＣＦＴＲ、先天性高インスリン症におけるＫＣＮＪ１１、鎌状赤血球症におけるＨＢＢ；ＰＲＫＡＲ１Ａ、ＩＲＦ６およびその他の翻訳を増加させるために使用され得る（Barbosa et al., Plos Genetics 9:e1003529, 2013; Calvo et al., PNAS 106:7507-12, 2009）。

【０３２３】
（実施例２６）
Ｃａｓ１３による合成致死遺伝子スクリーニング
本明細書で開示されるＣａｓ１３ｄ酵素およびバリアントは、例えば、リード小分子または阻害性ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）を模倣することによって、治療的化合物の識別を補助する

ために、スクリーニング方法において使用され得る。例えば、腫瘍サプレッサーまたは癌遺伝子についての合成致死相互作用を利用することで、目的のがん細胞または他の細胞を選択的に阻害する化合物（例えば、小分子または阻害性ＲＮＡ）の識別が可能になる。化学的化合物、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９およびＲＮＡｉによる合成致死遺伝子相互作用の発見のための従来のハイスループットスクリーニングは全て、未知のまたは複数の標的遺伝子（化学的化合物について）、オフターゲット遺伝子に対する多面的な効果（化学的化合物およびＲＮＡｉ）、および不適切な二重機能喪失（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９または他のヌクレアーゼベースのアプローチについて）を含む制限を有する。

【０３２４】

１）公知の標的遺伝子または遺伝子のセットを標的にするためのその特異性、および２）小分子リードの阻害機構をより正確に反映するそのノックダウン機構、に起因して、薬理学的に方向付けられた合成致死性について「第２のヒット」をモデリングする際のこれらの課題に対処するための腫瘍学リード発見において、本明細書で開示されるＣａｓ１３ｄ酵素およびバリアントを使用するための方法が提供される。例えば、Ｃａｓ１３ｄまたは他のＣａｓ１３酵素は、特定の突然変異を有する細胞（例えば、ＫＲＡＳ突然変異体肺がん細胞、ＢＲＣＡ－ヌル卵巣がん細胞およびその他多数）中に、同族ガイドＲＮＡと共に導入され得る。次いで、成長阻害または細胞喪失の表現型読み出しが、アレイされたフォーマットまたはガイドＲＮＡプールされた遺伝子スクリーニングのいずれかにおいて実施され、その後、目的の遺伝子を識別するための遺伝子分析が行われ得る。

【０３２５】

参考文献

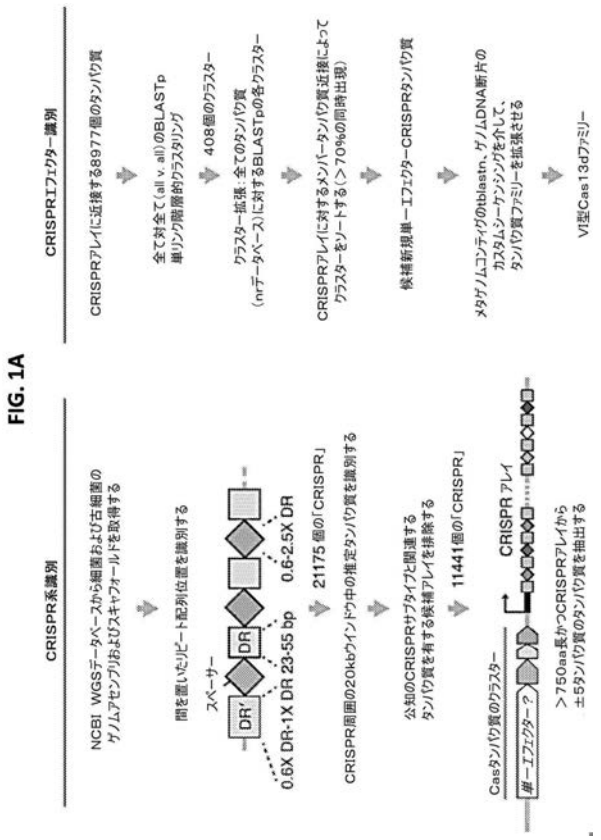
Abudayyeh (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13 . Nature. 550:280-4.
Abudayye et al., (2016). Science 353, aaf5573.
Almeida et al., (2012). Cell Rep 2, 789-798.
Anantharaman et al., (2013) Biol Direct 8, 15.
Batra et al., (2017). Cell 170, 899-912 e810.
Birmingham et al., (2006) Nat Methods 3, 199-204.
Biswas et al., (2016) Stem Cell Reports 7, 316-324.
Bland et al., (2007). BMC Bioinformatics 8, 209.
Boeve, B.F., and Hutton, M. (2008). Arch Neurol 65, 460-464.
Cheong, C.G., and Hall, T.M. (2006). Proc Natl Acad Sci U S A 103, 13635-13639.
Chiriboga et al., (2016). Neurology 86, 890-897.
Chylinski et al., (2013). RNA Biol 10, 726-737.
Cox et al., (2017). Science 358, 1019-1027.
Deltcheva et al., (2011). Nature 471, 602-607.
Dobin et al., (2013). Bioinformatics 29, 15-21.
Doench et al., . (2003). Genes Dev 17, 438-442.
Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Science 346, 1258096.
Du et al., (2006). Mol Cell Proteomics 5, 1033-1044.
East-Seletsky et al., (2017). Mol Cell 66, 373-383 e373.
East-Seletsky et al., (2016). Nature 538, 270-273.
Edgar, R.C. (2007). BMC Bioinformatics 8, 18.
Fonfara et al., (2016). Nature 532, 517-521.
Gasiunas et al., (2012). Proc Natl Acad Sci U S A 109, E2579-2586.
Gilbert et al., (2014). Cell 159, 647-661.
Gilbert et al. (2013). Cell 154, 442-451.
Grissa, I., Vergnaud, G., and Pourcel, C. (2007). Nucleic Acids Res 35, W52-57.
Hammond, S.M., and Wood, M.J. (2011). Trends Genet 27, 196-205.

Heidrich et al.,. (2015). Methods Mol Biol 1311, 1-21.
Heinz et al., (2010). Mol Cell 38, 576-589.
Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Cell 157, 1262-1278.
Jackson et al., (2003). Nat Biotechnol 21, 635-637.
Jinek et al., (2012). Science 337, 816-821.
Ka et al., (2005) Alzheimer Dis Assoc Disord 19 Suppl 1, S29-36.
Kim et al. (2017). Nat Commun 8, 14500.
Liu et al., (2017). Cell 168, 121-134 e112.
Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Genome Biol 15, 550.
Makarova et al. (2015). Nat Rev Microbiol 13, 722-736.
Matera, A.G., and Wang, Z. (2014). Nat Rev Mol Cell Biol 15, 108-121.
Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. Nature 526, 351-360.
O'Connell et al., (2014). Nature 516, 263-266.
Orengo, J.P., Bundman, D., and Cooper, T.A. (2006). Nucleic Acids Res 34, e148.
Peabody, D.S. (1993). EMBO J 12, 595-600.
Ran et al., (2015). Nature 520, 186-191.
Samai et al., (2015). Cell 161, 1164-1174.
Schena et al., (1995). Science 270, 467-470.
Schoch et al., (2016). I Neuron 90, 941-947.
Shendure et al., (2017). Nature 550:345-53.
Shmakov et al., (2015) Mol Cell 60, 385-397.
Sigoillot et al., (2012). Nat Methods 9, 363-366.
Smargon et al., (2017). Mol Cell 65, 618-630 e617.
Smith et al., (2017). PLoS Biol 15, e2003213.
Swiech et al., (2015). Nat Biotechnol 33, 102-106.
Treu et al., (2016). Bioresour Technol 216, 260-266.
van der Oos et al., (2014).. Nat Rev Microbiol 12, 479-492.
Wang et al., (2015). Biomed Rep 3, 152-158.
Wright, A.V., and Doudna, J.A. (2016). Nat Struct Mol Biol 23, 876-883.
Yang et al., (2010). J Proteome Res 9, 1402-1415.
Yosef et al., (2012). Nucleic Acids Res 40, 5569-5576.
Zalatan et al., (2015). Cell 160, 339-350.
Zetsche et al.,. (2015). Cell 163, 759-771.
Zetsche, et al., (2017). A Survey of Genome Editing Activity for 16 Cpf1 orthologs. bioRxiv. doi: https://doi.org/10.1101/134015
Zhang et al., (2016). M Nucleic Acids Res 44, 1789-1799.
Zhang et al., (2013). RNeuron 78, 785-798.

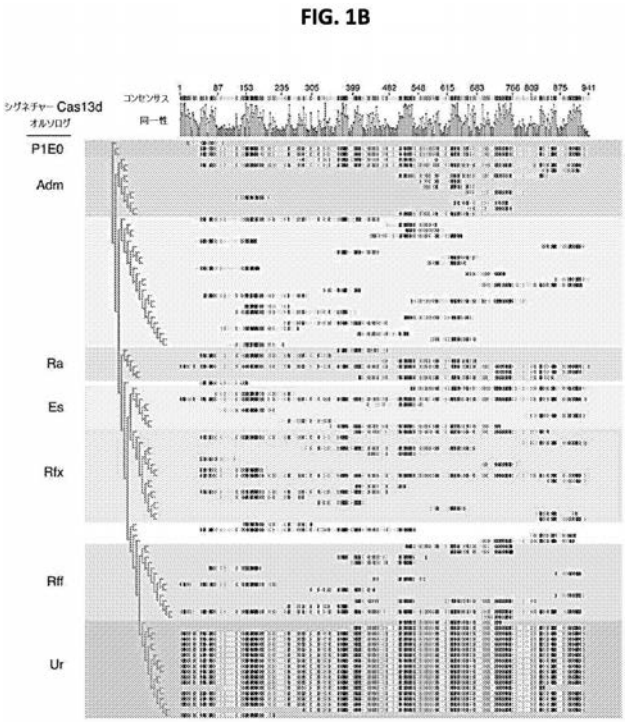
【０３２６】

本開示の原理が適用され得る多くの可能な実施形態を考慮すると、例示された実施形態は、本発明の例に過ぎず、本発明の範囲の限定と解釈すべきでないことを認識すべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、本発明者らの発明として、これらの特許請求の範囲の範囲および精神に入るものを全て特許請求する。

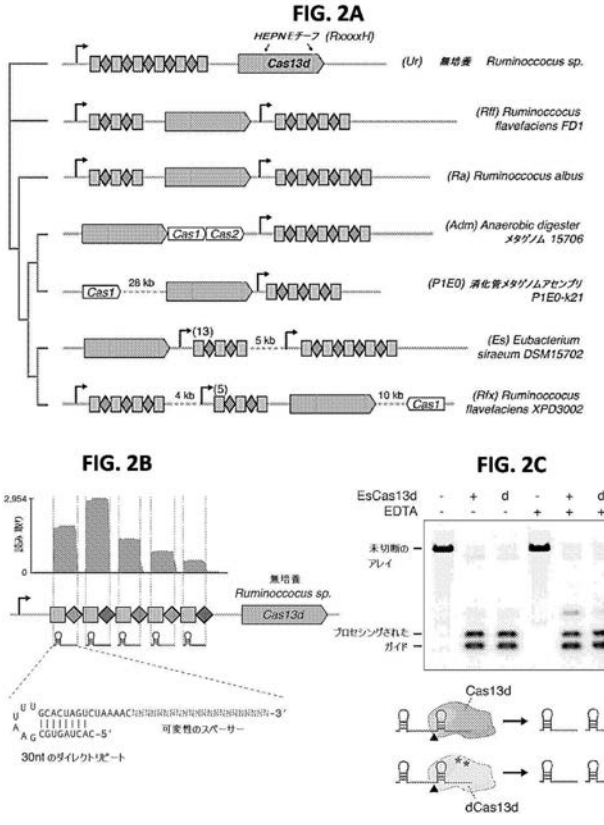
【図１Ａ】



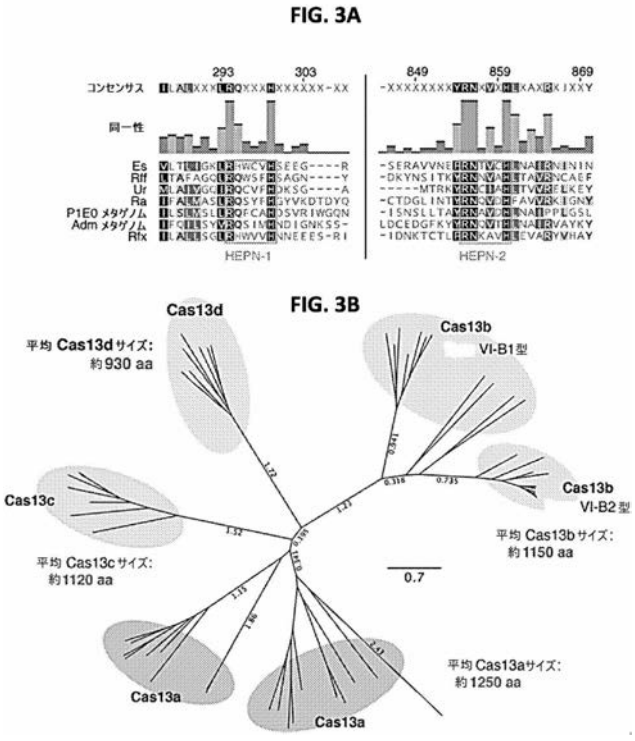
【図１Ｂ】



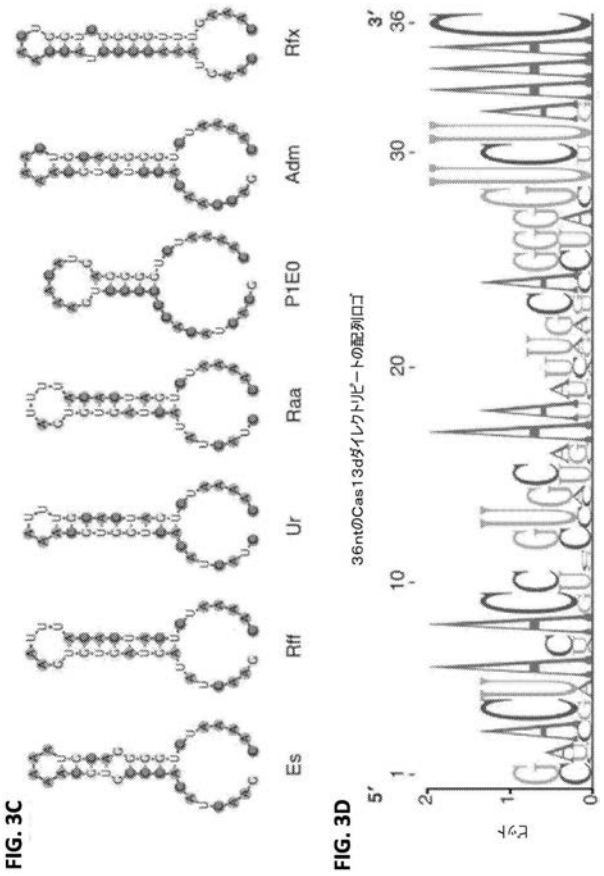
【図２】



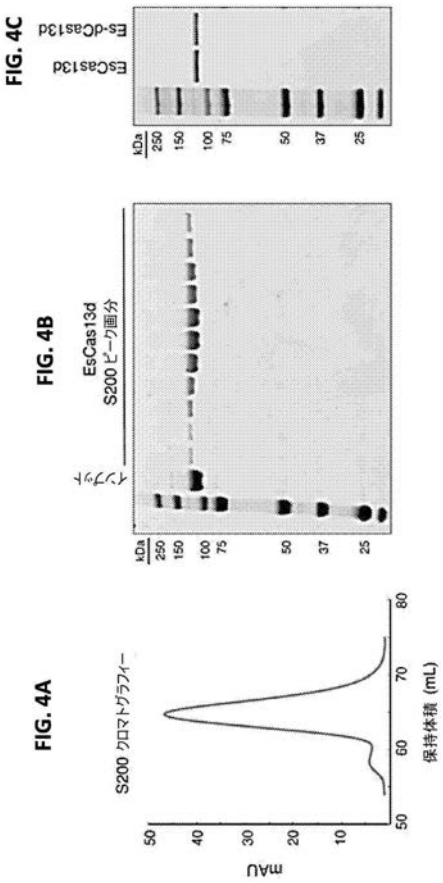
【図３Ａ－Ｂ】



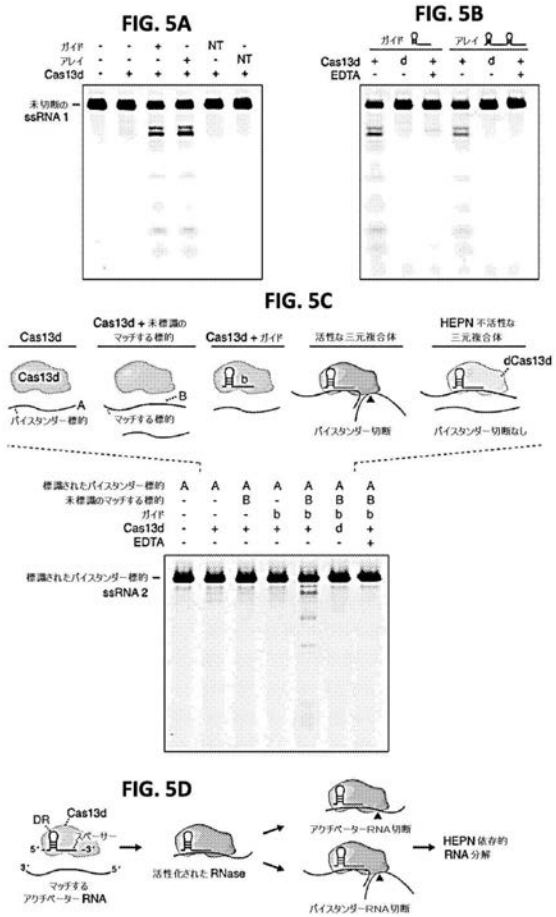
【図３Ｃ－Ｄ】



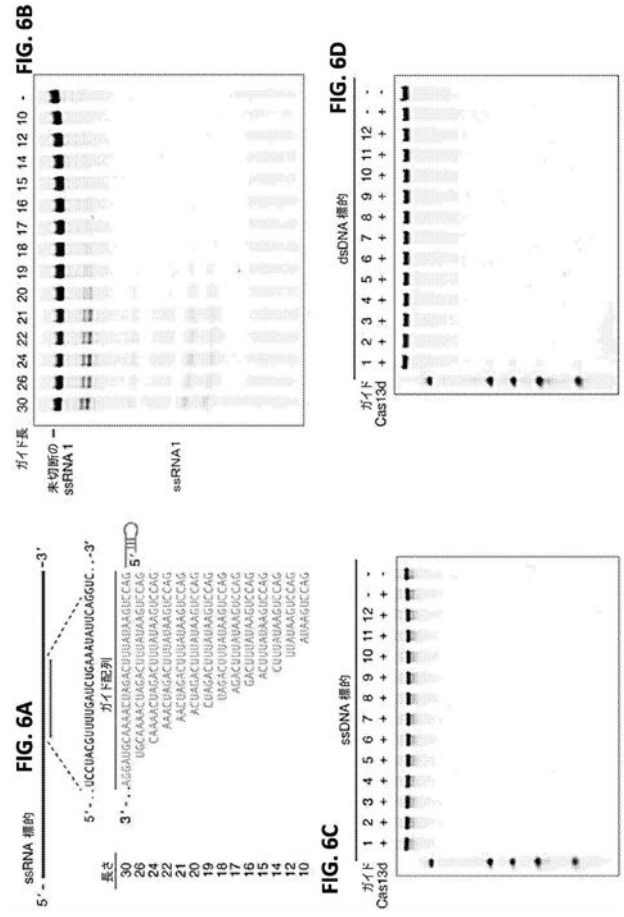
【図４】



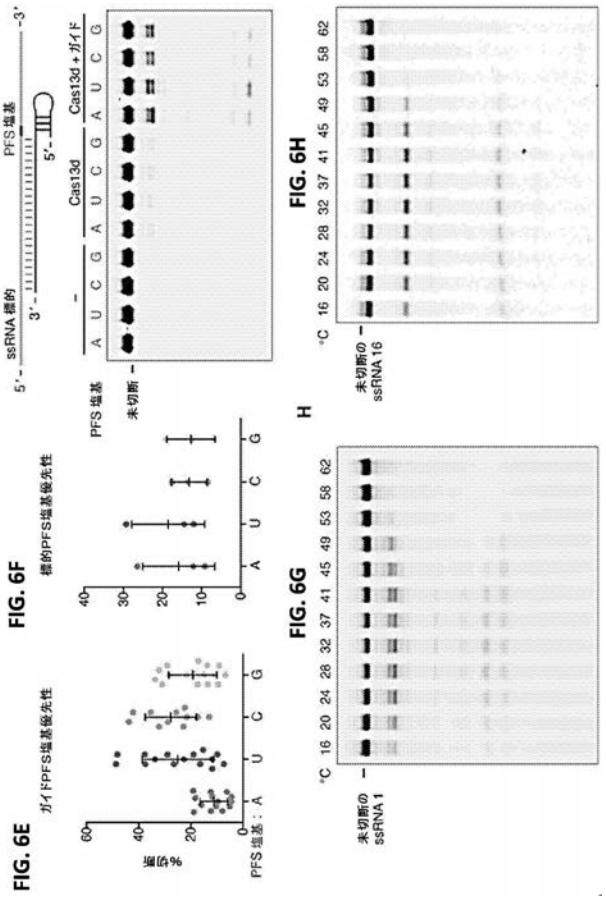
【図５】



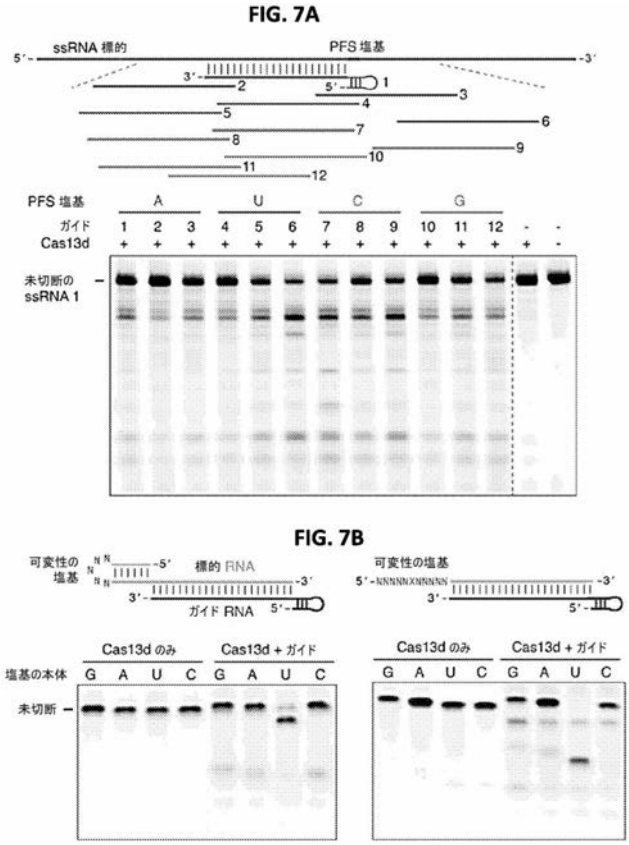
【図６Ａ－Ｄ】



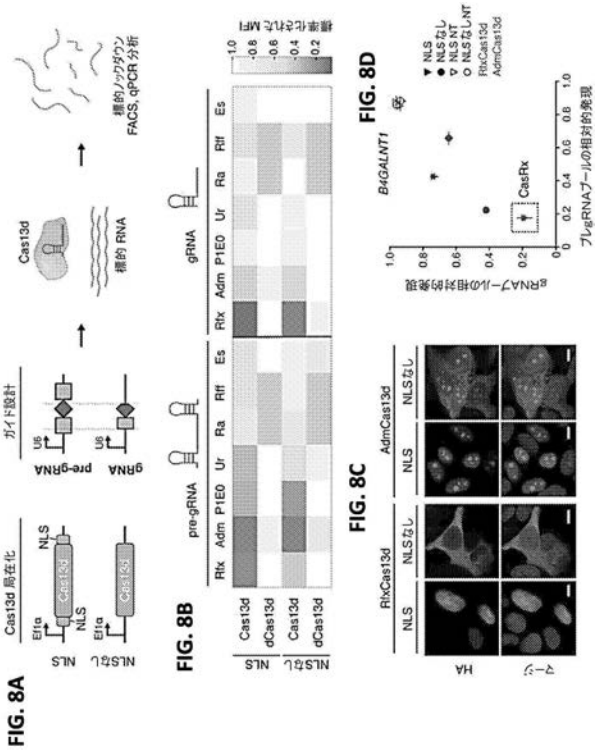
【図６Ｅ－Ｈ】



【図７】

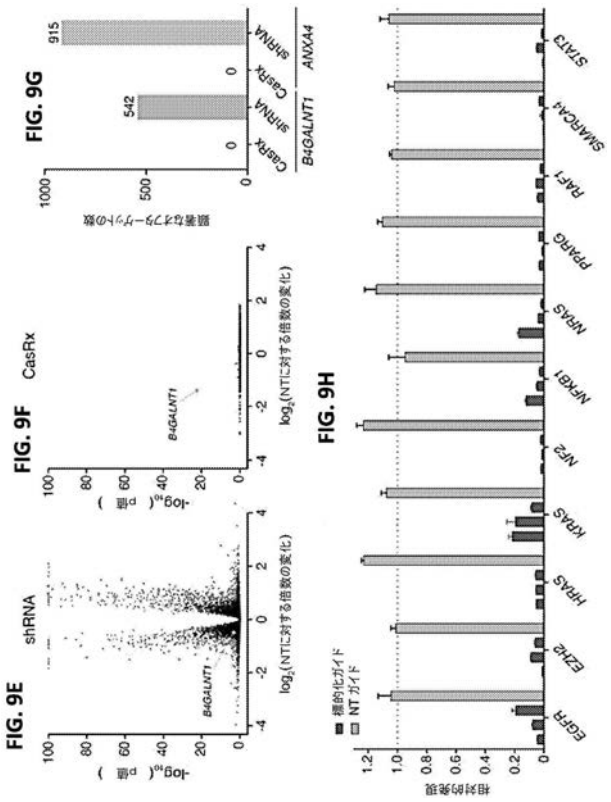


【図８】

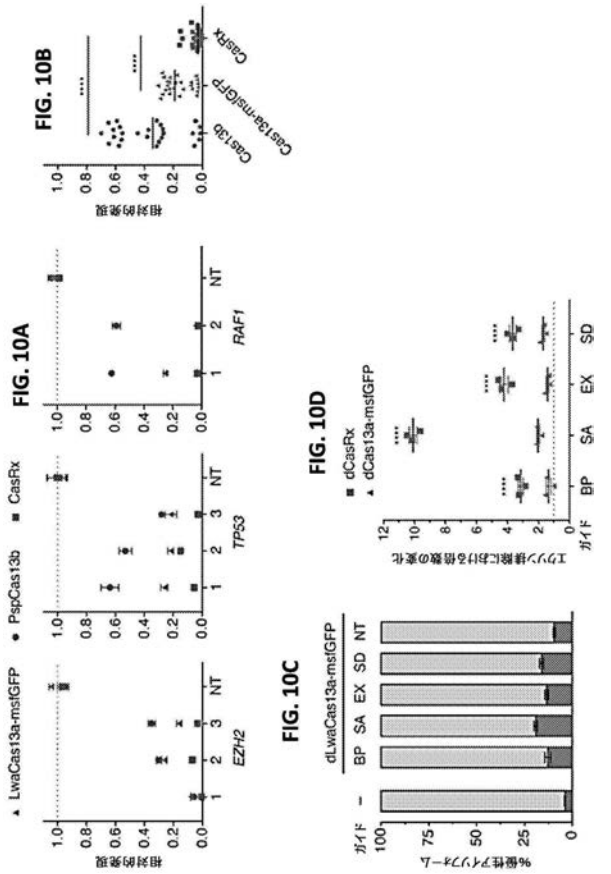


【図９Ａ－Ｄ】

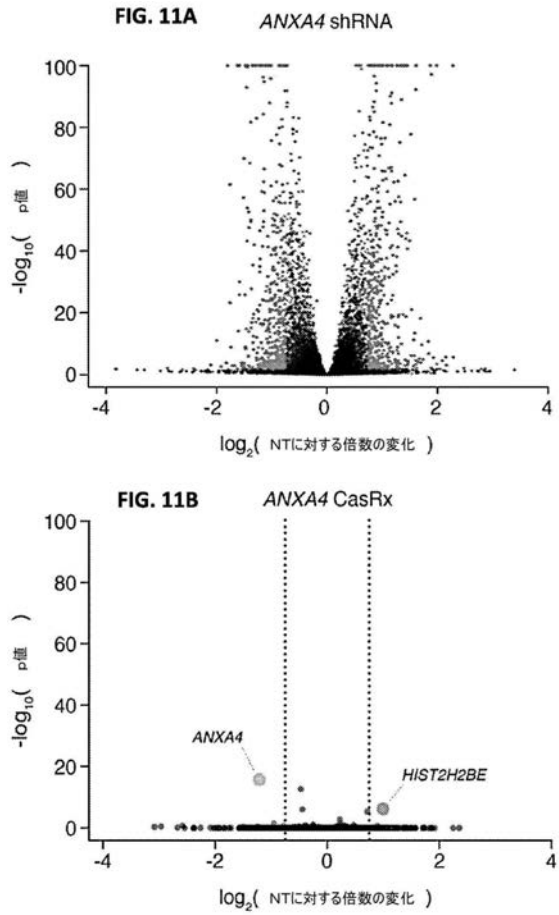
【図９Ｅ－Ｈ】



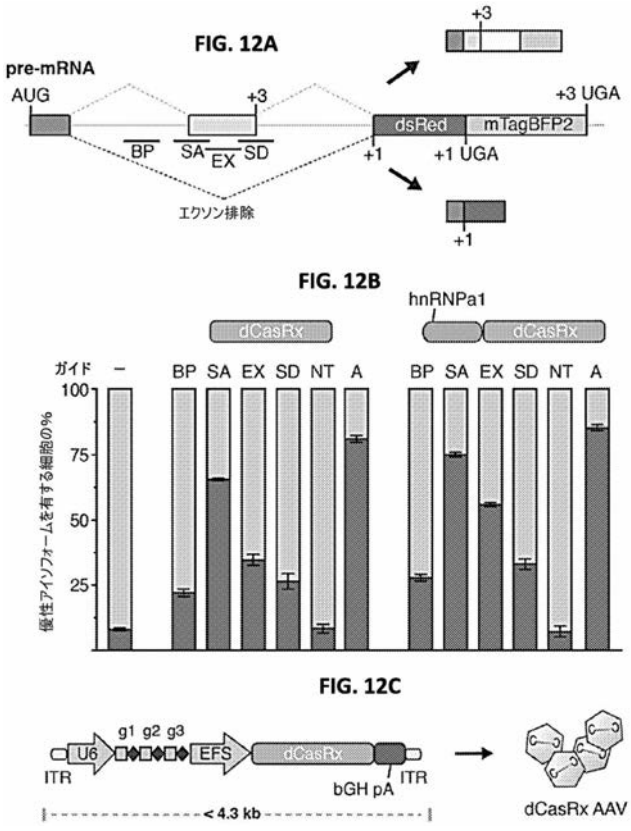
【図１０】



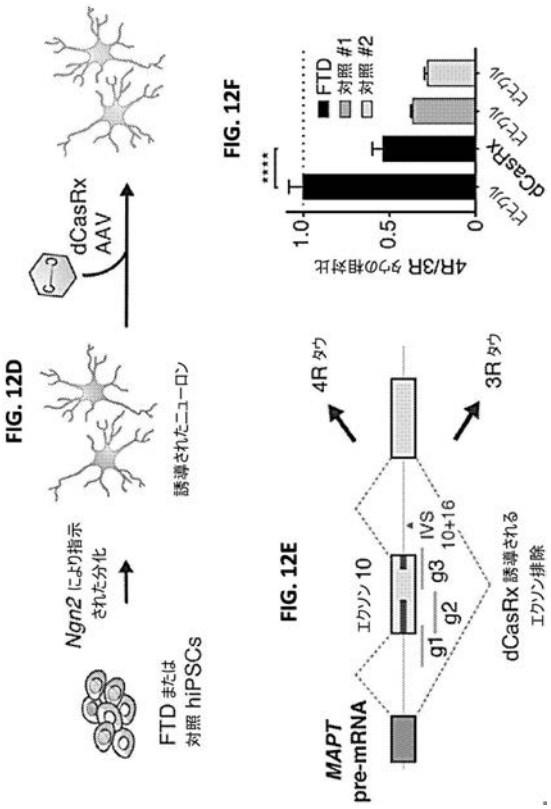
【図１１】



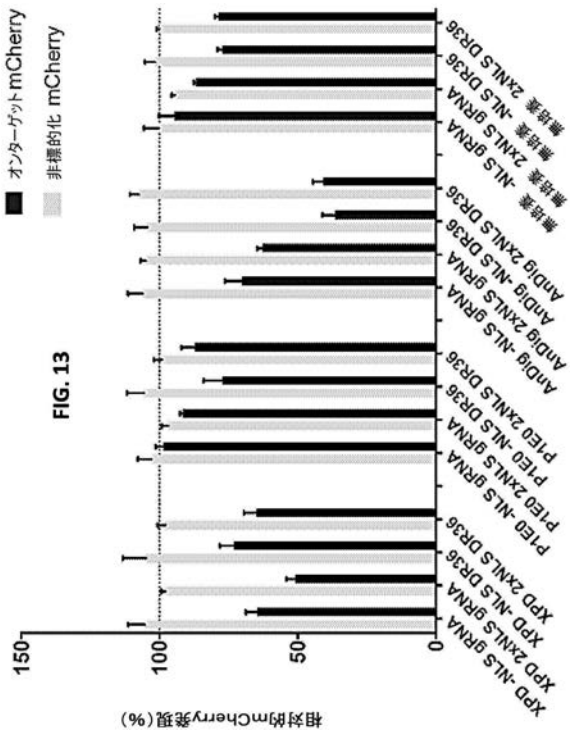
【図１２Ａ－Ｃ】



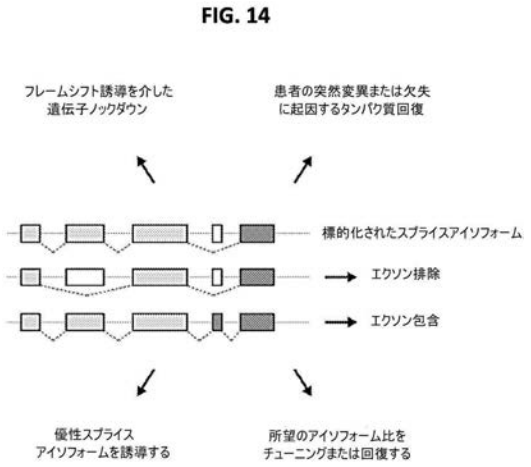
【図１２Ｄ－Ｆ】



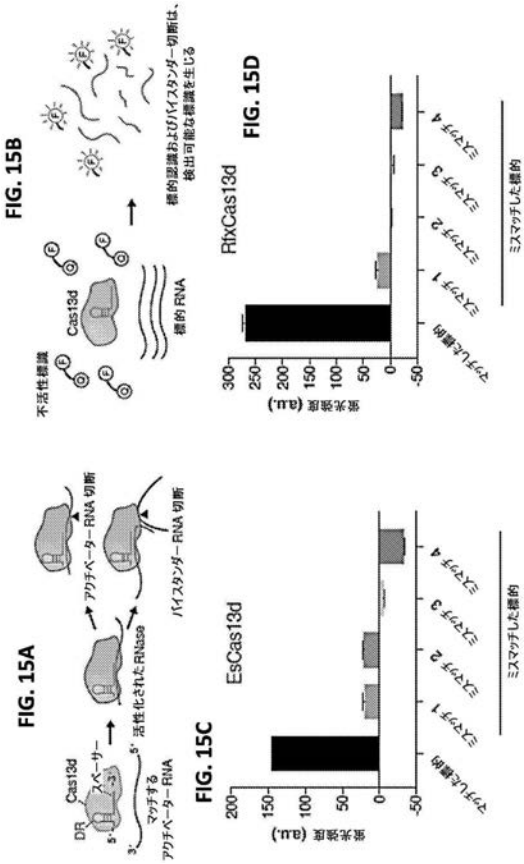
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【図１６Ａ】

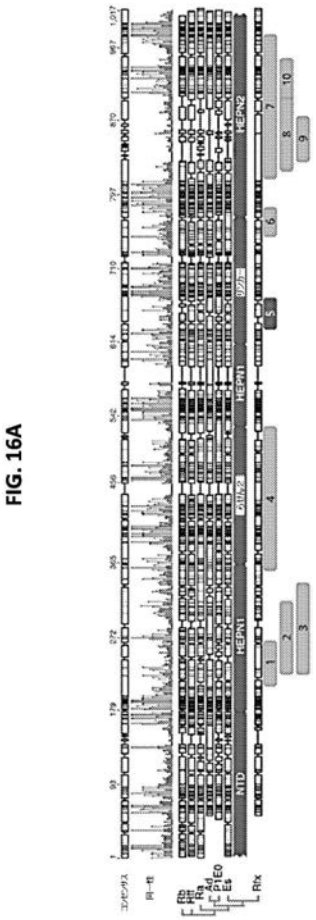
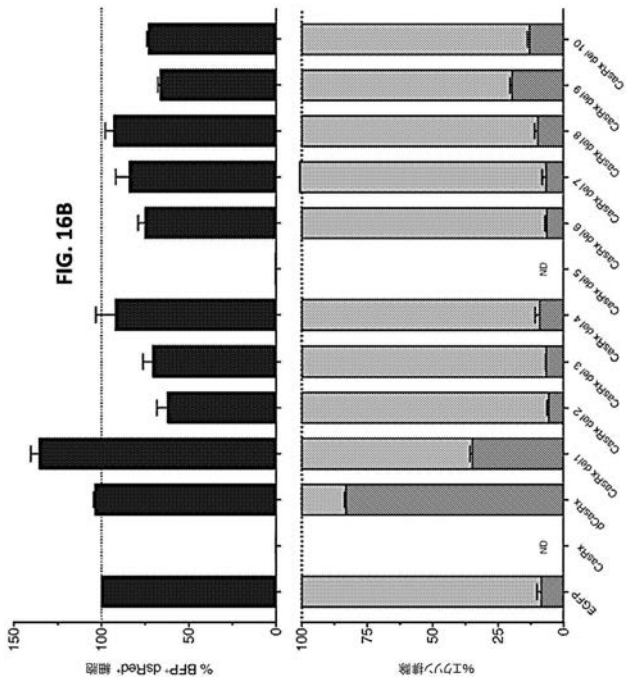
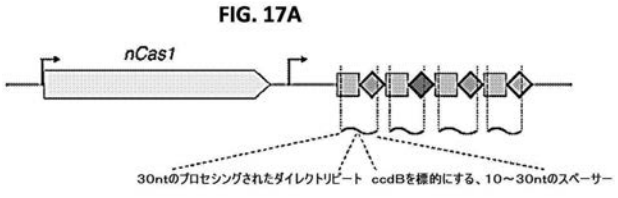


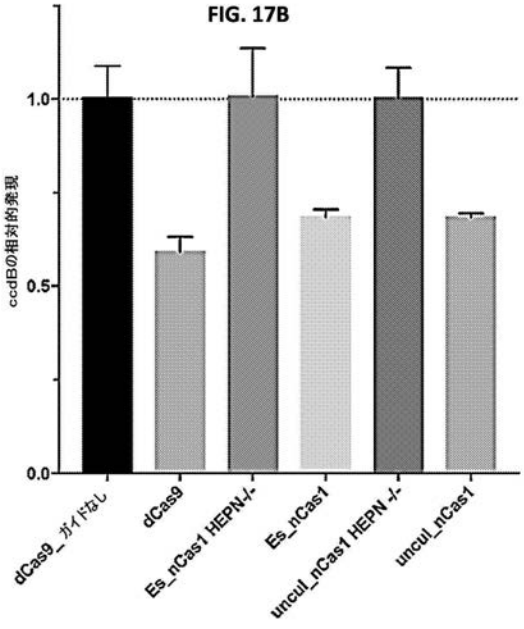
FIG. 16A

【図１６Ｂ】



【図１７】





【図１８Ａ】



FIG. 18A

【図18B】

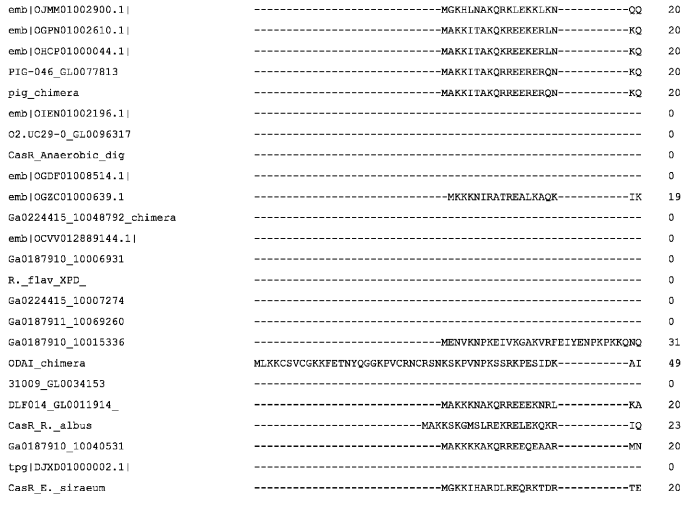


FIG. 18B

【図18C】



FIG. 18C

【図18D】



FIG. 18D

【図18E】



FIG. 18E

【図18F】

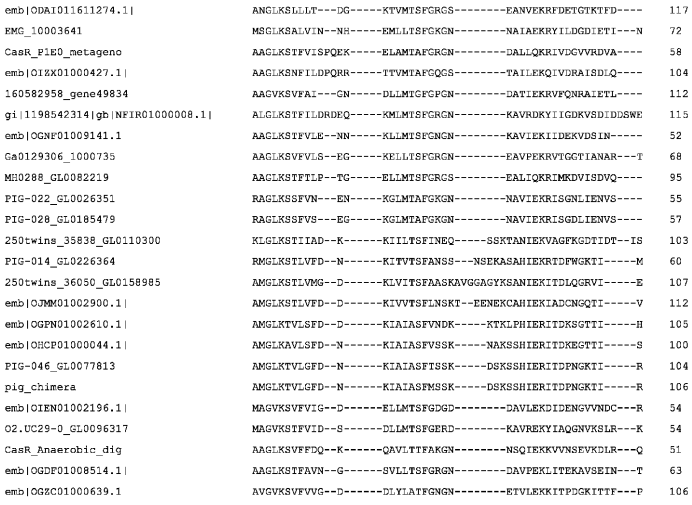


FIG. 18F

【図18G】

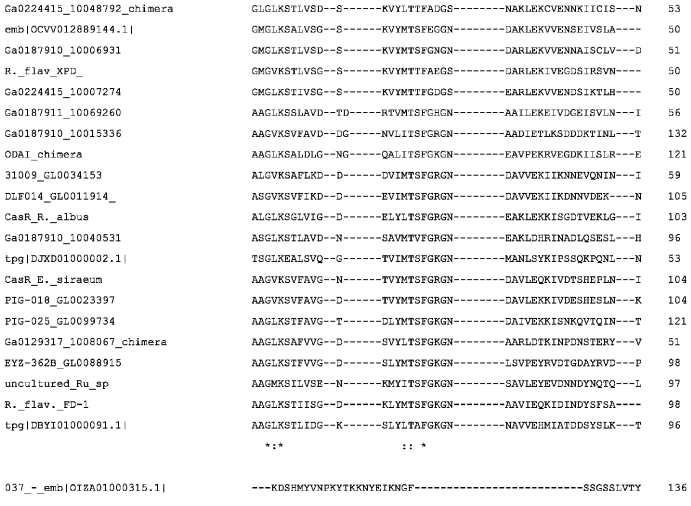


FIG. 18G

【図18H】



FIG. 18H

【図18I】

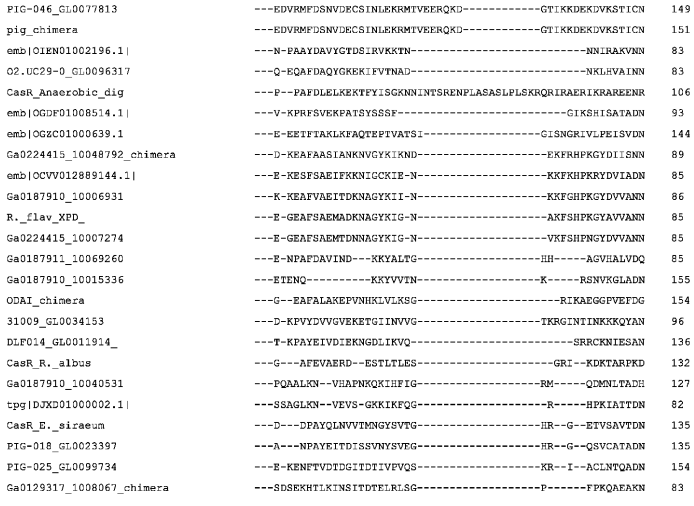


FIG. 18I

【図18J】

```
EYZ-362B_GL0088915                ---IS-EHSELHVLGADDLAVSFSG-------------------TRRMK--DVSELKADN   133
uncultured_Ru_sp                  ---SSKDNSNIQLGGVNEVNITFSS-------------------KHGFE--SGVEINTSN   133
R._flav._FD-1                     ---M-KDIPSLEVDKAESKEISFSS-------------------HHPFV--KNDKLTTYN   133
tpg|DBYI01000091.1|               ---L-ENEPSLKVKAADELKVTFMS-------------------RRPFV--QESELSAVN   131

037_-_emb|OIZA01000315.1|         PNK-----------PDKNSGMDALCLKPYFEIDFFG-----HIF--TDNMHIQAIYNIFD   178
emb|OCTW011587266.1|              TDK-----------LSDKSGMDDLGFKRELELEVFG-----QCF--DDSIHIQIAHAVFD   131
k87_11092736                      EYES------LISNPAESPREDYLGLKGTLERKFFG-----DEY-PKDNLRIQIIYSILD   136
BMZ-11B_GL0037915                 PVND------LIDESRKEYGQDYLMLKDQLEKVFFG-----QTF-PGDNLRIQIIYNILD   136
BMZ-11B_GL0037771                 TIEA------LLINPSEKVGEDYLKLKGTLEKRFFG-----REF-PHDNIRIQLIYNILD   127
BMZ-11B_GL0069617                 SLLG------TLLNPAENDPVDYLGLKSTLEKEFFG-----QEF-PNDSIRIQIIHNILD   121
Ga0099364_10024192                GHAT------FLNNPAEHVGTDYLKLKETLEMEFFG-----KSF-PGDSVRIQIIHQILD   130
530373_GL0023589                  --------KKTAQVVLPACSDNQLHAKDTIEQMYFG-----KTY--TDNIHIQIAYNIMD   128
emb|ODAI011611274.1|              ----------LAYRPAGVRPDQIGAKAALEKRYFG-----KET-PGDNIHVQIAYQIQD   188
EMG_10003641                      PLFD---QSPTAIQFNRTSGNDMIGIRRMLERKYFVHNEENKEF--QDNIRIQIAYCILD   156
CasR_P1E0_metageno                PLHR---A-ETPRRQPLGAGMDQLRRKAILEQKYFG-----RTF--DDNIHIQLIYNILD   139
emb|OIZX01000427.1|               PLYR---R-KD---GGFVPGMDALRRKNVLEQRFFG-----KSF--ADNIHIQMIYSILD   181
160582958_gene49834               LQD-----------NYNRPHFDLLGCKNVLEQKYFG-----RTF--SDNIHVQIAYNIMD   191
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|  PVL-----------SGNKKDDDLIHCRKNLEEMYFG-----QQF--KDNIHIQLIYNILD   189
emb|OGNF01009141.1                PLK-----------SKKTAGDDAIHSRKFLERQFFDG----NTF--NDNIHIQLIYNILD   126
Ga0129306_1000735                 PLA-----------VSRAPGQDLIGAKTALEERYFG-----RAF--ADNIHMQVIYAIQD   137
MH0288_GL0082219                  PRA-----------SQKPAGADLIGAKPALEKRYFG-----KTF--TDNIHIQLIYRILD   175
PIG-022_GL0026351                 PRE-----------SQKPVGEDGIHCKRALEERYFG-----KTF--NDNIHIQLIYSILD   124
```

FIG. 18J

【図18K】

```
PIG-028_GL0185479                 PRE-----------SQKPVGEDGIHCKRALEERYFG-----KTF--NDNIHIQLIYSILD   126
250twins_35838_GL0110300          PAN-------------FPIGRDYVKIRSALEKQYFG-----KEF-PEDNLHVQIAYNVAD   172
PIG-014_GL0226364                 PAL-------------RNCGKDYIGMKNSVEKVMFG-----KEF-PNDNLHIQIAYNILD   138
250twins_36050_GL0158985          PVV-------------TNIGKDYIGLKSRLEQEFFG-----KTF-ENDNLHVQIAYNILD   176
emb|OJMM01002900.1|               PAF-------------EDCGRDYINVKSALEKRVFG-----KTY-NKDNLHVQIAYNIFD   181
emb|OGPN01002610.1|               PYF-------------KTCGKDYIGIKDVAEKYFFG-----KTF-PNENLRVQIAYNVFD   191
emb|OHCP01000044.1|               PYF-------------KVGGKDYIGIKEIAEEHFFG-----RAF-PNENLRVQIAYNIFD   186
PIG-046_GL0077813                 PYS-------------NECGKDYIGIKSVAEELFFG-----RTF-PNDNLRVQIAYNIFD   190
pig_chimera                       PYS-------------NECGKDYIGIKSVAEELFFG-----RTF-PNDNLRVQIAYNIFD   192
emb|OIEN01002196.1|               PLAKSNIRSEESALFRTRVNEYKREQKDKYETLFFG-----KTF--DDNIHIQLISKILD   136
O2.UC29-0_GL0096317               PLCGNKKQSPEAQEYSRRVLEHKKAINQKYETIVFG-----KPS--NDNIHIQVVSKIMD   136
CasR_Anaerobic_dig                PYHNV-----------KRVGEDDLRAKADLEKHYFG-----KEY--SDNLKIQIIYNILD   148
emb|OGDF01008514.1|               PLAGR-----------APVGEDAIHAKEVLEQRVFG-----KTF-SDDNIHIQLIYNILD   136
emb|OGZC01000639.1                PLHTI--MQK--NTIKRSAGEDILQLKDVLENRYFD-----RSF--NDDLHIRLIYNILD   193
Ga0224415_10048792_chimera        PLLHN-----------NSVQQDMLGLKNVLEKRYFG-----KSSGGDNNLCIQIIHNIID   133
emb|OCVV012889144.1|              PLYK------------GSVRQDMLGLKETLEKRYFN-----SAD-GTDNVCIQVIHNILD   127
Ga0187910_10006931                PLYT------------GPVQQDMLGLKETLEKRYFG-----SSVSGNDNICIQVIHNILD   129
R._flav_XPD_                      PLYT------------GPVQQDMLGLKETLEKRYFG-----ESADGNDNICIQVIHNILD   128
Ga0224415_10007274                PFYT------------GPVQQDMLGLKEILERRYFG-----SSTDGNNTICIQIIHNILD   128
Ga0187911_10069260                PQN---------------RSDAVHIRGALEKKYFG-----DTF--ADNIHVQIAYNILD   122
Ga0187910_10015336                PTKV----------ESIIPGETQIGFKSILEKHFFG-----RTF--NDNIHIQIIHNILD   198
ODAI_chimera                      PQKNS----------SMSAVRLDEYNNQIERKFFRGN---KVL--QDNIRIQIAHNIMD   198
31009_GL0034153                   TQV----------SQKRMGMDLIQRKDKLEKVFFN-----ENF--NDNIHIQLIYNILD   138
DLF014_GL0011914_                 TEL----------PPEKIGMDLIRCKDKLEEIYFG-----RTF--NDNIHIQLIYNILD   178
```

FIG. 18K

【図18L】

```
CasR_R._albus                     PRHI-----T--VDTQGKFKEDMLGIRSVLEKKIFG-----KTF--DDNIHVQLAYNILD   178
Ga0187910_10040531                PLHSH--------DGERAVGADLLCAKDKLEQLYFG-----RTF--NDNIHIQLIYQILD   172
tpg|DJXD01000002.1|               PLFK------------PQPGMDLLCLKDKLEMHYFG-----KTF--DDNIHIQLIYQILD   123
CasR_E._siraeum                   PLRRFNGRKK--DEPEQSVPTEMLCLKPTLEKKFFG-----KEF--DDNIHIQLIYNILD   186
PIG-018_GL0023397                 PLHHD---------GGSSVPTDMLCLKPILERVYFG-----KTF--DDNLHIQLIYNILD   179
PIG-025_GL0099734                 PLYRK--------DSENQVQPDKLLLKDTLEKVYFG-----KTF--NDTLHIQLIYNILD   199
Ga0129317_1008067_chimera         PTHK-----K--DNEQKNTRQDMLGLKSTLEKFYFG-----STF--DDNIHIQIIHNIQD   129
EYZ-362B_GL0088915                PLHSC----K--NNLVPKNGTDILGLKGILEQRYYG-----RNF--DDNVHIQIIYNILD   180
uncultured_Ru_sp                  PTHRS--------GESSPVRGDMLGLKSELEKRFFG-----KTF--DDNIHIQLIYNILD   178
R._flav._FD-1                     PLYGG----K--DNPEKPVGRDMLGLKDKLEERYFG-----CTF--NDNLHIQIIYNILD   180
tpg|DBYI01000091.1|               PLHSG----K--DKPNKSAGQDMLGLKSELEKRYFG-----KIF--DDNLHIQIIHNILD   178
                                                .  *   :           : : ::    : *

037_-_emb|OIZA01000315.1|         IEKILAKHITNIIYTVNSFDRNYNQ-----------SGNDTIGF--------DLNYRV   217
emb|OCTW011587266.1|              IQKSLAAVIPNVLYTLNNLDRSYST---------DNTSDKKDIIGN--------TLNYQH   174
k87_11092736                      IQKILGLYVEDILHFVDGLQDEP---------------EDLVGL---------GLG--D   169
BMZ-11B_GL0037915                 MQKAPGLYVNDVLYAVNNLQNTGRL-------LTDDDWTSDVIGL---------ALG--K   178
BMZ-11B_GL0037771                 IYKILGMNVADILYALGNMQDTE--------------LDIDMFGQ---------SLN--N   162
BMZ-11B_GL0069617                 IQKILGIYINDVLYSIANLQNVE--------------TVEDCLGQ---------SLS--K   156
Ga0099364_10024192                IQKLLGIYITDIIYCINNLRDETHL-----------DHESDIVGL---------SMS--N   168
530373_GL0023589                  MKKIPGVYSNNIIYSINNLLEE--------------REGSDFLGV---------FYTEN   164
emb|ODAI011611274.1|              IEKLLAVYISNIIYAVNNVTGVSAM-------KDSKGRPVDLLGD--------YGILGEE   233
EMG_10003641                      IEKILMPHINNICFEINNMLRL-E-----------GYQEDSFMGS----------FNLYK   194
CasR_P1E0_metageno                IHKMLAVPANHIVHTLNLLGGY---------------GETDFVGM----------LPAGL   174
```

FIG. 18L

【図18M】

```
emb|OIZX01000427.1|               IHKILAAASGHIVHLLNIVNGS--------------KDRDFIGM----------LAAHV   216
160582958_gene49834               IEKLLTPYINNIIYTLNELMRD--------------NSKDDFPGCDSHFSVAYLYDELKA   237
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|  IEKILAVQINNIVFILNNLLRW-S-----------GEEEFDLIGS----------LGVNH   227
emb|OGNF01009141.1                IEKILSVHVNDIVYSVNNILSRGE-----------GMEYNDYIGT--------L---NLK   164
Ga0129306_1000735                 INKILAVHANNIVYTLNNLDRE-A-----------DPETDDFIGS--------GYLTLKN   177
MH0288_GL0082219                  IKKVLAIHANNIVYTLDNLSRR-E-----------GTEGTDFIGI--------GGLTLKN   215
PIG-022_GL0026351                 LEKILAVHSNNIVYTFDNLRRK-E-----------TDEYDDFIGY----------MSTVN   162
PIG-028_GL0185479                 LEKILAVHSNNIVYTFDNLRRK-E-----------TDEYDDFIGY----------MSTVN   164
250twins_35838_GL0110300          IKKILSVYINNIIYMFYNLARSEEYDIFYNSQSENSGRDCDVIG----------SLYYQA   222
PIG-014_GL0226364                 IKKIICPYINNVVNIFYNLGRGKLK-----------DDKNDLLG----------KQIGP-   176
250twins_36050_GL0158985          IKKILGTYVNNIIYIFYNLNRAGTG--------RDERMYDDLIG----------TLYAYK   218
emb|OJMM01002900.1|               IKKIIGAYINNIIYIFYNLGREEYD-----------AKKDIIG----------TQ----   215
emb|OGPN01002610.1|               IQKILGTYVNNIIYSFYNLRRDG-K-----------SDVDIIG----------SLYAFA   228
emb|OHCP01000044.1|               VQKILGTFVNNIIYSFYNLSRDEVQ-----------SDNDVIG----------MLYSIS   224
PIG-046_GL0077813                 IQKIFGTYINNIIYSFYNLSRDEFQ-----------SDNDVIG----------TLYMLK   228
pig_chimera                       IQKILGTYINNIIYSFYNLSRDESQ-----------SDNDVIG----------TLYMLK   230
emb|OIEN01002196.1|               IEKTFSVVIGNIVYAINNLSLEQS-----------IDRPIDIFGD--------KNTQ---   174
O2.UC29-0_GL0096317               IEKTFSFVMGNIVYAINNLDPEQN----------IDNPIDYMSN--------KART---   174
CasR_Anaerobic_dig                INKIISPYINDIVYSMNNLARNDEY----------IDGKIDVIG----------SLSSTT   188
emb|OGDF01008514.1|               IRKILSTYANNVVFTINSMRRLDE-----------YDREQDYLG----------YLYTGN   175
emb|OGZC01000639.1                IEKILAEYTTNAVFAIDNVSGCS----------------DDFLS----------NFSTRN   227
Ga0224415_10048792_chimera        IEKILSEYIPNVVYAFNNIAGFKDE----------HNNIIDIIGT--------QTYNSSY   175
emb|OCVV012889144.1|              IEKILAEYITNAVYSFDNIAGFG----------------EDIIGM--------GGFKPIY   163
Ga0187910_10006931                IEKILAEYITNAAYAVNNIAGLD----------------KDIIGF--------GKFSTVY   165
```

FIG. 18M

【図１８Ｎ】

【図１８Ｏ】

【図１８Ｐ】

【図１８Ｑ】

【図18R】

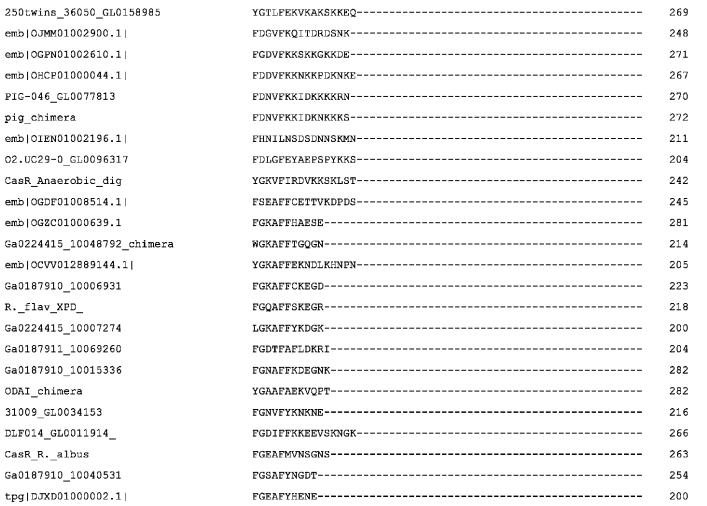


FIG. 18R

【図18S】



FIG. 18S

【図18T】



FIG. 18T

【図18U】



FIG. 18U

【図18V】

```
530373_GL0023589                  SAWMFNLEKVLT----------PERKKLLTALIDSRTNHINN-HF  332
emb|ODAI011611274.1|              FAWLYRLDRQLS----------QEYRKLLGEFYDAQVDKVNK-SF  346
EMG_10003641                      NSSIYTLDSSYDSTMNTAELLGKGDDSSLVALATDARVEARAILDEIYKKGVDSINN-SF  334
CasR_P1E0_metageno                TAALYHLQALP----------QDMKDLLDDGWRRALGGVND-HF  294
emb|OIZX01000427.1|               AAGLYNLRRLG----------PDMKKMLDTFYTEAFIQLNQ-SF  322
160582958_gene49834               KPFPYNLEKNLF----------PEAKQVLNSLFEEKAESLGAEAF  374
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|  RAEIYKLGKEFDRL----------EARGCRPEARKELDELYKKKIHEMNQ-GF  346
emb|OGNF01009141.1                SVIMYNLDNEELYK----------KLYNKKVEMALTGMKKVLDANFNKKVEHLNN-SF  300
Ga0129306_1000735                 SARIFRLDNDLG----------PGVDGARELLDRLYAEKINDLR--SF  333
MH0288_GL0082219                  RSWLYNLEKVLP----------AEAMQVLDGVYSQKVAALN--NF  377
PIG-022_GL0026351                 RNWLYSLDTMLN----------DDAKAVLDKYYVSTVSSLNK-HF  286
PIG-028_GL0185479                 RNWLYSLDTMLN----------DDAKAVLDKYYVSTVSSLNK-HF  288
250twins_35838_GL0110300          -AYLFDLSKLTRA----------AQDENRRQDIQSLLNILNSTCRSNLEGVNGD-F  349
PIG-014_GL0226364                 STALFNIEQFL----------NKEEKASLDEIYTGAIDKVNCD-F  293
250twins_36050_GL0158985          ESALFNIEDVL----------SADLKEILDEAFSGAVNKLNDG-F  343
emb|OJMM01002900.1|               DTALYNAKEFFAX----------ADPQINELIDAVYADGIKTINSD-F  324
emb|OGPN01002610.1|               LDALFNITEYFAK----------TAPELSKTINEIYKEGIDRINND-F  358
emb|OHCP01000044.1|               LEALFNISKAFGK----------KMPELKTLIDNIYSKGINAINDE-F  354
PIG-046_GL0077813                 LDALFNISSFFDA----------VAPELNEVINSVYSKGIYDINDN-F  357
pig_chimera                       LDALFNISRFFDA----------VAPELNEVINSVYSKGIDDINDN-F  359
emb|OIEN01002196.1|               PRSKYNLAVN----------YNEEIQKTISEPFNRKVEEVQQD-F  294
O2.UC29-0_GL0096317               PSKKFNLDQ----------KGKNLIYRNAFKYKTDTIKKQ-Y  284
CasR_Anaerobic_dig                KSSILAIEK----------YPARFVGFLSDLLKTKTNDVNRM-F  312
emb|OGDF01008514.1|               RTVMFTLGQNSVR----------DRKNGFDELAELLDYLYDEKIDTVNRD-F  322
```

FIG. 18V

【図18W】

```
emb|OGZC01000639.1                RLWLYQLEDA----------LSREYQETMNNCYNSTIYGLQKD-F  349
Ga0224415_10048792_chimera        RTWLYKLDDTNI----------LNAEVYKTLNYLYDTIADELTKS-F  285
emb|OCVV012889144.1|              YRWLYNLDSI----------LNREYISTLNYLYDDIADELTES-F  281
Ga0187910_10006931                RKWLYNLDKN----------LDKEYITTLDYMYSDIADELTKS-F  292
R._flav_XPD_                      RTWLYNLDKN----------LDNEYISTLNYLYDRITNELTNS-F  287
Ga0224415_10007274                YTWLYNLDKY----------LDAEYITTLNYMYNDIGDELTDS-F  270
Ga0187911_10069260                DTWLFSSAQLDQ----------TDPLFSEMLNRIYSHKIKTVNQN-F  281
Ga0187910_10015336                KANLYNLSNR----------LKVGSKEVLNQLYKEKIDKIDANGF  352
ODAI_chimera                      KTFLYNIVGYRN----------GTEINSKFTAVLDGIYSKKVEELNGN-F  352
31009_GL0034153                   NSWLYNLSQ----------LHNEFKSTLDSFYNEKIEDINGN-F  285
DLF014_GL0011914_                 NSWLYNLEK----------LEPEFKDTLDYFYNRKINDINKG-F  348
CasR_R._albus                     TTWAYTLEDKLK----------GPSHEFRETIDKIFDEGFSKISKD-F  335
Ga0187910_10040531                ADWMYRLEEA----------LPAEYKDTLDALYLEGVEGLDQS-F  324
tpg|DJXD01000002.1|               SFWLYQLEDQ----------LSDEFKETLSILWEEVTERIDSE-F  269
CasR_E._siraeum                   EFWLYKLDE----------LKDDFKNVLDVVYNRPVEEINNR-F  339
PIG-018_GL0023397                 EFWLYKLDS----------LNGEFIDVLNTLYNRSVNEINRG-F  320
PIG-025_GL0099734                 KTWIYNAENV----------LDSEYLDILDDVYGGLVEKINKN-F  335
Ga0129317_1008067_chimera         LKWLYNFHNFK----------SNKPFLDTLDKHFDEMIDRINKN-F  272
EYZ-362B_GL0088915                RVWLYQLDEK----------LSKEHKDTLNYFFDQRYDEIHEN-F  329
uncultured_Ru_sp                  RFDLYSFINN----------IDPEYRDTLDYLVEERLKSINKD-F  333
R._flav._FD-1                     RTWLYKLDS----------LDKEYLDTLDHYFDKRFNDINDD-F  337
tpg|DBYI01000091.1|               RTWIYQLDNPK----------LAQEYRDTLDYFFNERFDATNKD-F  337
                                                                                  :  :
```

FIG. 18W

【図18X】

```
037_-_emb|OIZA01000315.1|         I-SNE-KNNLYIILKAYGEDTENVEVVKKYSKELYKLSVLKTNKNLGVNVKKLRESAIEY  386
emb|OCTW011587266.1|              L-NNE-GNNLYIILKATNWD------IKKIVPQLYRFSVLKSDKNMGFNMRKLREFAVES  338
k87_11092736                      L-SNS-AKNLMVLYQVFKDDTD--EKKKARARQYYHFSVLKEGKNLGFNLTKIREYFLDK  330
BMZ-11B_GL0037915                 M-ATS-RANLVLLFRILNAKTK--EEKEKIAVDYYKFAIRKEGKNLGVNLKKAREILLDK  344
BMZ-11B_GL0037771                 F-SKN-KVNLAILFDLLDVRDV--KQKKRISDEFYRFTIRKDGKNLGMNLVKIREIIIDR  343
BMZ-11B_GL0069617                 F-NNS-RMNLKILYLVLNAATL--EDKKKITEEYYRFSILKEGKNLGVNMRKLREMMVDM  321
Ga0099364_10024192                C-KNA-AINVHPLTELLPE-----ESKKQLTEDYFRFAILKEGKNLGVNMKRLREVMFAL  380
530373_GL0023589                  I-ENS-NKNLNAIPRLFPEKS-----QADLIVEYYDFSVRKAYKNLGFSVKLLREMLLKT  385
emb|ODAI011611274.1|              L-TNS-TVNLEVLFRALKTGTD--PERKTVTQEYYQFTVRKEDGNLGFSLKTLREILLSA  402
EMG_10003641                      L-SNS-INDLENLFKIYKCDSS--EKKTELIKQYYDFCIRKPQMNMGFSITTIREGMFTR  390
CasR_P1E0_metageno                L-DIN-KVNLLTLFEYYGAETK--QARVALTQDFYRFVVLKEQKNMGFSLRRLREELLKL  350
emb|OIZX01000427.1|               Q-DEN-TTNLTCLFDILNISDS--ARQKQLAEEFYRYVVFKEQKNLGFSVRKLREEMLLL  378
160582958_gene49834               G-KTAGKTDVSILLKVFEKEQASQKEQQALLKEYYDFKVQKTYKNMGFSIKLLREAIMEI  433
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|  L-KNS-KSDILMLFRIYNAESK--EAKRKLAQEYYEFIMLKSYKNTGFSIKHLRETMIDK  402
emb|OGNF01009141.1                I-KNS-AKDFVILCEVLGIKSR--DEKTKFVKDYYDFVVRKNYKHLGFSVKELRELLFAN  356
Ga0129306_1000735                 D-KTSASSNFRLLFNAYHADN---EKKKELAQEFYRFSVLKVSKNTGFSIRILREKIIED  389
MH0288_GL0082219                  S-KTSSKSNFRLLFNALHADTD--AQKKQIAEDFYKFSVRKTYKNIGFSIKLLRESMLDT  434
PIG-022_GL0026351                 V-DNSAKKDFSIIFNALNITDI--ELKKNIAKEYYEFVCRKNFKNIGFSIKKLREYLLEK  343
PIG-028_GL0185479                 V-ENSAKKDFSIIFNALNITDI--ELKKNIAKEYYEFVCRKNFKNIGFSIKKLREYLLEK  345
250twins_35838_GL0110300          V-KHA-KNNLYVLNQLYPS-----LKANDLIGEYYNFIVKKENRNIGIRLIITVRELIIEH  402
PIG-014_GL0226364                 N-KNS-SNNLYILEQIYCN-----D--KNLGQRYYDFVVKKSQCNLGLDTKLIRELLIRK  344
250twins_36050_GL0158985          V-QHS-GNNLYVLQQLYPN-----ETIERIAEKYYRLTVRKEDLNMGVNIKKLRELIVGQ  396
emb|OJMM01002900.1|               M-AHA-KNNMYIICEVYKN-----EAEDSLMKEYYDFVVRKEGNNLGFNTRQLREILIDK  377
emb|OGPN01002610.1|               V-TNG-KNNLYILSKVYPD-----MQRNELVKKYYQFVVCKEGNNVGINTRKLKESISQ  411
```

FIG. 18X

【図18Y】

```
emb|OHCP01000044.1|               V-KNG-KNNLYILSKVYPN-----EKREVLLREYYNFVVCKEGSNIGISTRKLKETMIAQ  407
PIG-046_GL0077813                 V-KND-KNNFYILSKIYPE-----VARENLLKEYYYFVVSKEGNNIGISTKKLKEAIIAQ  410
pig_chimera                       V-KNG-KNNFYILSKIYPE-----VAREDLLREYYYFVVSKEGNNIGISTKKLKEAIIVQ  412
emb|OIEN01002196.1|               Y-RNS-CVNIDFLKEIMYGSNYTDRGSDSLECSYFNFAILKQNKNMGFSITSIRECLLDL  352
O2.UC29-0_GL0096317               A-QNS-KVNINFLSYVLYGNGCTEEQKKELSREYFNFAILKQYKNLGFSITSLREQLLSL  342
CasR_Anaerobic_dig                IDNNS-QTNFWVLFSIFGL-QDHTSGADKICRNFYDFVIKADSKNLGFSLKKIRELMLDL  370
emb|OGDF01008514.1|               L-RNQ-KNNIELLSRIYGS-SADSPERDRLVQNFYDFRVLSQDKNLGFSIKKLREKLLDS  379
emb|OGZC01000639.1                E-KTN-APNLNFLAEILGK-N-----ASELAEPYFRFIITKEYKNLGFSIKTLREMLLDQ  401
Ga0224415_10048792_chimera        S-KNG-AVNVNYLAKKYNI-K---DDLPGFSEQYFRFSIMKEQKNLGFNISKLRENMLDF  339
emb|OCVV012889144.1|              S-KNS-SANVNYIAETLNI-D-----PSEFAQQYFRFSIMKEQKNMGFNVSKLREIMLDR  333
Ga0187910_10006931                S-KNS-AANVNYIAEILNI-D-----SKTFAEQYFRFSIMKEQKNLGFTLTKLRECMLDR  344
R._flav_XPD_                      S-KNS-AANVNYIAETLGI-N-----PAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGFNITKLREVMLDR  339
Ga0224415_10007274                S-KNS-AANINYIAETLGI-D-----PKTFAEQYFRFSIMKEQKNLGFNLTKLREVMLDR  322
Ga0187911_10069260                FENNR-KANFPILKKMYPE-----TTLKVLMNEYYDFSIRKGYKNFGFSIKSLREALLSP  335
Ga0187910_10015336                VNKGC-KRDFSILFKSLNL-T-TDKDKGELVVGFYDFSIRKNYKNIGFSIKTLREYMLKI  409
ODAI_chimera                      I-KNS-KKDLTILFSAFGC-Q-DEASKKKLIEKYYDFIVKKINKNMGFSVTKLREKIIEG  408
31009_GL0034153                   I-EKN-KVNIQILCNDLKL------DKNKLVQDYYNFLISKNHKNMGFSIKKIREYILDI  337
DLF014_GL0011914_                 I-KTN-QINLHIICDELGL-N---WDKEQVVGDYYDFLIAKKYKNIGFSIKKIREHMFDI  402
CasR_R._albus                     G-KMN-KVNLQILEQMIGE-LYGSIERQNLTCDYYDFIQLKKHKYLGFSIKRLRETMLEI  392
Ga0187910_10040531                L-KNN-TVNIQILCSIFNH-----DDPNKIAEEYYGFLMIKEYKNMGFSIKKLRECMLEL  377
tpg|DJXD01000002.1|               L-KTN-TVNLHILCHVFPK-----ESKETIVRAYYEFLIKKSFKNMGFSIKKLREIMLEQ  322
CasR_E._siraeum                   I-ENN-KVNIQILGSVYKN-----TDIAELVRSYYEFLITKKYKNMGFSIKKLRESMLEG  392
PIG-018_GL0023397                 V-DTN-KVNIQILQAVCKN-----MDLISLIKAYYEFLITKKYKNMGFSIKKLREMMLAE  373
PIG-025_GL0099734                 I-KDN-KVNLILLSDILDM-K-SKDDFEELIRQYYRFIITKEQKLLGFSITKIREAMLED  391
```

FIG. 18Y

【図18Z】

```
Ga0129317_1008067_chimera  I-KNN-TPDLIILSGLYPD-----MAKKELVRLFYDFTTVKEYKNMGFSVKKLREKMLES  325
EYZ-362B_GL0088915         N-KTN-KVNLELLAEAFPS-----EDYATLANQYYDFTVFKAHKNLGFSIKKLREKLIEN  382
uncultured_Ru_sp           I-EDN-KVNISLLIDMMKG-----YEADDIIRLYYDFIVLKSQKNLGFSIKKLREKMLDE  386
R._flav._FD-1              V-TKN-ATNLYILKEVFPE-----ANFKDIADLYYDFIVIKSHKNMGFSIKKLREKMLEC  390
tpg|DBYI01000091.1|        I-ETN-NINLHILKEVFPA-----EDFQKLAALYYDFIVKKTPKNIGFSIKNLREQMLEC  390
                                  :.  :                    :          *.     :*  .

037_-_emb|OIZA01000315.1|  GYCPLP-----YDKEKEVAKLSSVKHKLYKTYDFVITHYLNSN----------------  424
emb|OCTW011587266.1|       KNIDL--------SRLNDKFLTNNRKKLYKVIDFIIYYHLNKVL--------------K  375
k87_11092736               FFPIFH-----SSAPDVKRKVDTFRSKFYAILDFIIYEASVSV-----ANSGQMGKVAPW  380
BMZ-11B_GL0037915          HYPD-----------AKNKQFDSYRGKLYTITDFIIYRMAAED----------------  376
BMZ-11B_GL0037771          YASG-----------LRDKKHDPHRQKINVIADFLIFRALSQN----------------  375
BMZ-11B_GL0069617          FYSE-----------IKDKQYDSYRQKIYTILDFLLFREIKDS----------------  353
Ga0099364_10024192         FVPELT-------APETKKRYDSYRAKIYGLTDFLLFKHIHNT----------------  416
530373_GL0023589           QQELS---------PLNDKAYDSIRSKLYTMFDFVLYKLYVD----------------N  419
emb|ODAI011611274.1|       YKH-----------EVRDKEYDSIRHKLYQLFSFALYHYYKTG--------------VG  436
EMG_10003641               CSEANTLLLCDEGSTVKLNVHDTMKSKFYKNLDFMIYKYYKYE--------------N  434
CasR_P1E0_metageno         PDAA----------YLTGQEYDSVRQKLYMLLDFLLCRLYAQE----------------R  384
emb|OIZX01000427.1|        PDAA----------VIADKRYDTCRSKLYNLMDFLILRVYRTG----------------R  412
160582958_gene49834        PDAA----------KFKDDLYSSLRHKLYGLFDFILVKHFLDT----------SDSE  470
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|  MDEDK-------KEKLKDDKYNPIRRKIYRIMDFMIYQYYQEP--------------EH  440
emb|OGNF01009141.1         HDSNKYIK---EFDKISNKKFDSVRSRLNRLADYIIYDYYNK----------------N  396
Ga0129306_1000735          HAA-----------QYRDKIYDSMRKKLFSTFDFFLWRFYEE----------------R  421
MH0288_GL0082219           FAP-----------EYKEKSYDSVRGKLYQLVDFLTWNIYDK----------------N  466
```

FIG. 18Z

【図18AA】

```
PIG-022_GL0026351          PEFC----------NLKEDKYNSVRSKLYRLIDFIIYLNYKDAKF----------ENDN  382
PIG-028_GL0185479          PEFR----------NLKDDKYNSVRSKLYRLIDFIIYLNYKDAKF----------KNDN  384
250twins_35838_GL0110300   NYI-----------NLKDSKYDTYRNKIYTVLNFILFREIQEN----------------  434
PIG-014_GL0226364          LSD--------EGLDINDSRYDTYRNKIYTVFGFILYYELTKN----------------  379
250twins_36050_GL0158985   YFPE--VLDKEYDLSKNGDSVVIYRSKIYTVMNYILLYYLEDH----------------  437
emb|OJMM01002900.1|        YVG-----------NLRGKKYNTFRNKLYTVLGFILVKEIKRN----------------  409
emb|OGPN01002610.1|        HPWI--TTPQD---NNKANDYESCRHKLYTIMCFILVAELDAH----------------  449
emb|OHCP01000044.1|        NMP-------------SLKEENTYRNKLYTVMNFILVRELKNC----------------  437
PIG-046_GL0077813          DMS-----------YIKSKDYDTYRNKLYTVLCFILVKELNER----------------  442
pig_chimera                DMS-----------YIKSEDYDTYRNKLYTVLCFILVKELNER----------------  444
emb|OIEN01002196.1|        YEL------------NFESMQNLRPRANSFCDFLIYDYYCKNE----------------  383
O2.UC29-0_GL0096317        YDI------------DFECKRNLRSRANSFCDYVLYYRYAVQF----------------  373
CasR_Anaerobic_dig         PNA----------NMLRDHQFDTVRSKFYTLLDFIIYQHYLEE----------------  403
emb|OGDF01008514.1|        PAL----------SVVRSKKYDTMRSKIYSLIDFMIYRKFSEN----------------  412
emb|OGZC01000639.1         PDLQ--E------IRENENVYDSIRSKLYKMIDFVLVYAYSNERK--------------  438
Ga0224415_10048792_chimera KDMS--V------IRDDHNRYDKDRSKIYTMMDFVIYRYYIDNNN----------  376
emb|OCVV012889144.1|       KELS--D------IRDNERVFDSIRSKLYTMMDFVIYRYYIEEAAKTEAENRNLPENEKK  385
Ga0187910_10006931         EELS--D------IRDNEKVFDSIRSKLYTMMDFVIYRYYIEEAKKIENENKTLSDDKKK  396
R._flav_XPD_               KDMS--E------IRKNEKVFDSIRTKVYTMMDFVIYRYYIEEDAKVAAANKSLPDNEKS  391
Ga0224415_10007274         KDMS--E------IRENHNDFDSIRAKVYTMMDFVIYRYYIEEAAKVNAANKSLPDNEKS  374
Ga0187911_10069260         QYES--LIGV---QIKDNKEYDTVRSKLYQLFDFALTRYFNQH----------------  373
Ga0187910_10015336         SNS------T---LCADTISNNAIRPKAYKLYDFIIWHYYMNK----------------  443
ODAI_chimera               YRFR--G------NPVTGTDYDSVRHKLYRTFDFIICSYYDDH----------------  443
31009_GL0034153            DYA----------SYIKEQGYDSVRSKLFTLIDFIIYDLYVNKE----------------  371
```

FIG. 18AA

【図18BB】

```
DLF014_GL0011914_          YEA----------FDIKDKRFDSVRSIMYKIIDFVIYYSFIHYK----------------  436
CasR_R._albus              TPA----------ECYKAECYNSERQKLYKLIDFLIYDLYYNRK----------------  426
Ga0187910_10040531         PEL----------SGYKEDQYNSVRSKLYKLFDFIIAHYFRKH----------------  410
tpg|DJXD01000002.1|        SDL----------KSFKEDKYNSVRAKLYKLFDFIITYYYDRH----------------  355
CasR_E._siraeum            KGY-------------ADKEYDSVRNKLYQMTDFILYTGYINED----------------  423
PIG-018_GL0023397          TAYT--SNPD---DRLYDKEINSVRNKLYQMTDFIIYLEYRDN----------------  411
PIG-025_GL0099734          TV------------FKTDKKYDSIRSKLYKLIDFMMFYKYITVDSE--------------  425
Ga0129317_1008067_chimera  EEA----------SDFRDKDYDSVRRKLYKLMDFCIYYLYYS-D----------------  358
EYZ-362B_GL0088915         --------------ALRDEKIDSFRSKLYRLIDFCLFRIYLK-D----------------  411
uncultured_Ru_sp           YG-----------FRFKDKQYDSVRSKMYKLMDFLLFCNYYRND----------------  419
R._flav._FD-1              DGA----------DRIKEQDMDSVRSKLYKLIDFCIFKYYHE-F----------------  423
tpg|DBYI01000091.1|        DEA----------EKIRSKDMNSVRSKLYKLFDFCIFYQYFI-D----------------  423
                                              :       : :

037_-_emb|OIZA01000315.1|  DKLLLEIVETLRLSK-----ND-DEKENVYKKYA---E-KLFKADDVINPIKAISKLFAE  474
emb|OCTW011587266.1|       DSFVDDFVAALRASQ-----SE-EEKEKLYAQYS---E-RLFADEGLKSAIKKAVDMISD  425
k87_11092736               KGAIDNALVKLREAP-----DE-EAKEKIYNVLA---A-SIRNDSLFL--RLKSACDKFG  428
BMZ-11B_GL0037915          GAFLEESVQKLRSTP-----SE-EEKEKVYDVLA---E-IIWNATKDD--VKKVFDIRQQ  424
BMZ-11B_GL0037771          QGIIDKTVSSLRLTK-----DE-EEKDHVYQNAA---E-LVWGMVSNC--LTPYFNDPKN  423
BMZ-11B_GL0069617          -EELETMVADLRESE-----SD-EKKEELYHDYA---E-LFWDGVKDL--IVPFFAAFDG  400
Ga0099364_10024192         -KQLEEWVAVLRETS-----NE-DAKENLYDEFA---R-TAWNTVGDS--AKQLIENMQS  463
530373_GL0023589           EEQIDQFVRKLRAST-----SN-VEKEALYQQES---E-RTWNEIRGQ--IIDNVIPFID  467
emb|ODAI011611274.1|       AERREAFVAKLRAVM-----TA-EAKQRAYADEA---A-EIWNDEGSG--IRAAFLEILE  484
EMG_10003641               PEKGEKLIEDLRSKIKGKKED-EDKKQRYAEES---A-CILKAKRDI--IKKDLTEAAN  487
```

FIG. 18BB

【図18CC】

```
CasR_P1E0_metageno         ADRCEELVSALRCAL-----SD-EEKDTVYQAEA---A-ALWQALGDT--LRRKLLPLLK  432
emb|OIZX01000427.1|        ADRCDKLPEALRAAL-----TD-EEKAVVYHKEA---L-SLWNEMRTL--ILDGLLPQMT  460
160582958_gene49834        NLQNNDIFRQLRACR-----CE-EEKDQVYRSIA---V-KVWEKVKKK--ELNMFKQVVV  518
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|  QEEAEELVRKLRNAE-----IE-AKKELAYRKEA---E-KLKKELEKI--IFNSVLPSCD  488
emb|OGNF01009141.1         NAKVSDLVKYLRAAA-----DD-EQKKKIYLNES---INLVKSGILER--IKKILPKLNG  445
Ga0129306_1000735          EDEAEELRACLRAAR-----SD-EEKEQIYAEAA---A-SCWPSVKPF--VESVAATLCD  469
MH0288_GL0082219           EKMADALVAQLRAEVK---RDR-DEKSPVYDREA---A-RLWTMIREA--VAQTAKTLRA  516
PIG-022_GL0026351          DEKIERFVSKLRKCP-----DE-ASKETVYQTES---D-IIKKSISGS--INSIKRGMM-  429
PIG-028_GL0185479          DEKIERFVSKLRKCP-----DE-ASKETVYQTEA---D-IIKKSISGS--INSIKRDMM-  431
250twins_35838_GL0110300   SIAIKNFREKLRSTE-----K--AEQPALYQAFA---N-KIYPMVQAK--FAKAIDLFEE  481
PIG-014_GL0226364          ETFCQEIVAKLRRFG-----GDEIEKNKIYNEYFLRKE-AVYNQIAEK--FKQSVCWFKK  431
250twins_36050_GL0158985   DSSRESMVEALRQNR-----EGDEGKEEIYRQFA---K-KVWNGVSGL--FGVCLNLFKT  486
emb|OJMM01002900.1|        PKIQDSFIAKLRANQ-----NGDEGKLNIYNEFA---P-KIWSVVSSK--LNSAITCFDE  458
emb|OGPN01002610.1|        ESIRDNMVAELRANM-----DGDDGRDAIYEKYA---K-DIYHIVKDK--LLAMQKVFDE  498
emb|OHCP01000044.1|        ATIREQMIKELRANM-----DEEEGRDRIYSKYA---K-EIYLYVKDK--LKLMLNVFKE  486
PIG-046_GL0077813          TTIREQMVADLRANM-----NGDIGREDIYSKYA---K-IIYAQVKPR--FDGMKNVFEE  491
pig_chimera                TTIREQMVADLRANM-----NGDIGREDIYSKYA---K-IIYAQVKPR--FDTMKSAFEE  493
emb|OIEN01002196.1|        -SERANLVDCLRSAA-----SE-EEKKNIYFQTA---E-RVKEKFRNA--FNRISRFDAS  430
O2.UC29-0_GL0096317        PERIVDLVDKLRCSA-----NE-KEKTNVYIEEA---N-RIKEDLRIA--FNRINNFDAK  421
CasR_Anaerobic_dig         KSRIDNMVEKLRMTL-----KE-EEKEVLYAAEA---K-IVWNAIGAK--VINKLVPMMN  451
emb|OGDF01008514.1|        HVAVDDFVEELRSLL-----TE-DEKESAYSRWA---ETLINDGFAQE--ILVKLLPQTD  461
emb|OGZC01000639.1         -SKADALASNLRSAI-----TE-DAKKRIYQNEA---D-QLWTSYQEL--FKRIRGFKGA  485
Ga0224415_10048792_chimera --DSIDFINKLRSSI-----DE-KSKEKLYNEEA---N-RLWNKLKEY--MLYIKEFNGK  422
emb|OCVV012889144.1|       ISEKDFFVINLRGSF-----DE-NQKEKLYIEEA---K-RLWEKLKDI--MLKIKEFRGE  433
```

FIG. 18CC

【図18FF】

```
emb|OIEN01002196.1|          YIKNSREKNLSGGS--SLPK-----YSPIEGFTKRSKKINDNDEKNADLFCNMLYYLAQF  483
O2.UC29-0_GL0096317          SIKLYSTKNNVDDQ--PMLP-----FEQVSK----DIKGGDAAREKADAFCDMTYYLTQF  470
CasR_Anaerobic_dig           GDALKEIKRKN-----------------RDRKLPQSVIATVQVNSDANVFSGLIYFLTLF  494
emb|OGDF01008514.1|          PAVIGKIKG----------------------KKLLNDSIAGIKLKKDASFFTKIINVLCMF  500
emb|OGZC01000639.1           QVKEYSSKN-M---------------P----IPIQKQIQNILKPAEQVTYFIKLMYLLTMF  526
Ga0224415_10048792_chimera   LASRTPDRD-G--------------NISEFVESLPKIHRLLPRGQKISNFSKLMYLLTMF  467
emb|OCVV012889144.1|         KVKEYK-------------------------KEVPRIERILPQCKDISAFSKLMYMLSMF  468
Ga0187910_10006931           MTRDYK-----------------------KSDTPTLNRILPESEDVSTFSKLMYALTMF  480
R._flav_XPD_                 KTREYK-----------------------KKDAPRLPRILPAGRDVSAFSKLMYALTMF  475
Ga0224415_10007274           DTRKYK-----------------------NMGTPRIRRLIPEGRDISTFSKLMYALTMF  458
Ga0187911_10069260           SAIKNIKAPEL------------------KPDQKELNGIMNSNALDVPHFCKLVYFLTRF  464
Ga0187910_10015336           IENTSYEITDK-----------------KQKEYYKMQINSLNSADKVSDFSKVIYLVTLF  534
ODAI_chimera                 GEGIKHITVDR-----------------FIAGAGAGKLIDKCSISTECDYFCKFIYLMTLF  535
31009_GL0034153              RRIFSQDND-------------------TNWNGVEFEKIGEQKLEDNADYFCKLMYFVTLF  462
DLF014_GL0011914_            NIKEFSDAKEDDV------------YYEEFKNFKFNEVGKEKLGENAEYFCKLMYLLTLF  532
CasR_R._albus                GETIKDLQKRY-----------------DDETANRIWDISQHSISGNVNCFCKLIYIMTLM  518
Ga0187910_10040531           SNITQMQKNEQQG--------------KT-KGMFAIRDEIRVSRKPVSYFSKVIYVMTLL  503
tpg|DJXD01000002.1|          KNIRDYQKKAN--------------------DYRISFEDIKIGNTGIGYFSELIYMLTLL  443
CasR_E._siraeum              DNIKKLSKS-------------------NIEIQEDKLRKCFISYADSVSEFTKLIYLLTRF  513
PIG-018_GL0023397            VNIKKLQQN-------------------TLEIPDSKLENCFIKSAEKVSAFTKLNYLLTRF  501
PIG-025_GL0099734            EGVISGLKK-------------------NKSYDNMSIEGIVAEETANVSYFSKIIYLLAQF  515
Ga0129317_1008067_chimera    SNIKKLEN--------------------VKEKFISEDEFDDIKLDIDISYFSKLMYVMCYF  447
EYZ-362B_GL0088915           RYSSGSNSTENAE---------------KKEDFPVFPHCHDKQKVSNVSLFAKLMYAFCLF  505
uncultured_Ru_sp             DVIKELGK--------------------ADMDFDEKILDSEKKNASDLLYFSKMIYMLTYF  508
```

FIG. 18FF

【図18GG】

```
R._flav._FD-1                WVTGEHEK-----------------------DITSVIDKDAYRNRSNVSYFSKLMYAMCFF  509
tpg|DBYI01000091.1|          WVKNDYSD-----------------------EVAKCIDLNEFRVNSNVSYFSKLLYAMSFF  509
                                                                          .        :

037_-_emb|OIZA01000315.1|    LDGKEINDLLTNIISKLQVIEDHNNVIKFIFH-------------------------NKD  548
emb|OCTW011587266.1|         LDGKEINILLNSLIKKFQDIHSFNITTVKKLSE-------------------------NNL  499
k87_11092736                 LEGKEINELVTALIKKFEGIQALIDLLRNLEGV---------------------------  508
BMZ-11B_GL0037915            LDGKEINELLSTFVNRLENVQALIDLAKNLGET---------------------------  495
BMZ-11B_GL0037771            LEGKEINELLTAYIHKFECIQDFLNVISSLGEN---------------------------  497
BMZ-11B_GL0069617            WDGKEVNEVLSAYIHKFESIQAFIDVLESKELN----------------------EKV  474
Ga0099364_10024192           WEGKEINELLSAYIHKFENIQEFINLLEKLEGK---------------------------  541
530373_GL0023589             LDSKEINMFFDALINELENIASFNDVLEQLDM----------------------------  545
emb|ODAI011611274.1|         LDGKEINELLTGLINKLENIQSFLDVMQQEHA-------------------------  566
EMG_10003641                 LSGKEINDLLTQLINKFENIAAFIRMYQNDQG----------------------------  567
CasR_P1E0_metageno           MDGKEINTLLTTLISKLENIDSLRSVLESMGL----------------------------  515
emb|OIZX01000427.1|          MDGKEINTLLTTLISKFENIAAFLQTMEQLNI----------------------------  549
160582958_gene49834          LDGKEINLLCTSLIEKFENIASFNEVLKSPQIG---------------------------  595
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|  LDGKEINILLTQLIHCFDNISSFMDTMEEENL----------------------  575
emb|OGNF01009141.1           MDGKEINDLVTTLINKFDNIASFIEVLKSQSV----------------------------  521
Ga0129306_1000735            LDGKEINDLLTTLIHAFENIDSFLSVLGSERL----------------------------  548
MH0288_GL0082219             LDGKEINDLITTLVNSFDEIDSFCCVLQKAKL----------------------------  608
PIG-022_GL0026351            IDGKEINDLLTTLIHQFENIASFIDVMKKENI----------------------------  506
PIG-028_GL0185479            IDGKEINDLLTTLIHQFENIASFIDVMKKENI----------------------------  508
250twins_35838_GL0110300     LDGKEINELLCALINKFDNIADLLDISKQIGT----------------------------  557
```

FIG. 18GG

【図18DD】

```
Ga0187910_10006931           LSEKDIFIISLRGSF-----SE-EQKDKLYSDEA---E-RLWAKLGKL--MLEIKKFRGQ  444
R._flav_XPD_                 LSEKDIFVINLRGSF-----ND-DQKDALYYDEA---N-RIWRKLENI--MENIKEFRGN  439
Ga0224415_10007274           LSEKDIFVISLRGSF-----NE-DQKDRLYYDEA---Q-RLWSKVGKL--MLKIKKFRGK  422
Ga0187911_10069260           PDMVDAFVVELRSLA-----KDEDAKNAVYEKYA---K-AVWNDVKQP--IAVMLSYMNG  422
Ga0187910_10015336           PDKINDFVEKLRIQN-----KN-DEKILKLYYDEA---V-CLLSELGRE--IHIMISCVHN  491
ODAI_chimera                 AKEKDTLVSSLRASL-----ND-TKKENLYAGEA---K-TIAESIKDR--MDTVCRMYNK  491
31009_GL0034153              KDRIDDIVSKLRGAI-----YD-YKKDDIYKAEA---D-WVWKKLNRQ--IKALTKLLSN  419
DLF014_GL0011914_            QDEVDEIVNYLRSTL-----SE-EQKKEKYIKLA---G-NIWAEYKTQ--FNKLKDILLA  484
CasR_R._albus                PARIEEIVDKLRESV-----ND-EEKESIYSVEA---K-YVYESLSKV--LDKSLKNSVS  474
Ga0187910_10040531           PEKGEEMVDCLRLCM-----TE-DEKDSHYEGTA---K-KLVRELAYD--MQEAAEQANG  458
tpg|DJXD01000002.1|          AFEKEALVSSLRSSL-----TE-ENKEEIYIKTA---R-TLASALGAD--FKKAAADVNA  403
CasR_E._siraeum              SDRADDLVNTLRSSL-----KE-DDKTTVYCKEA---D-YLWKKYRES--IREVADALDG  471
PIG-018_GL0023397            KSIIDTLVSKLRSSV-----TD-EAKEAVYREEA---A-NLRGRLLDA--VALIAKSLNG  459
PIG-025_GL0099734            KEHADSIVEKLRATL-----SG-ESKEEIYKAEA---N-RIWNLYEDI--IMNKIEPALD  473
Ga0129317_1008067_chimera    SERNENLVSRLRESL-----TD-ENKDIIYSKEA---K-IVWNELRKK--FSTILDNVKG  406
EYZ-362B_GL0088915           PDRAEKNVRFLRSCI-----NE-QEKEQFYTQEA---N-ALKSENPGL--VNDFCMQLKD  459
uncultured_Ru_sp             IAAGESLVRKLRFSM-----TD-DEKEGIYADEA---A-KLWGKFRND--FENIADHMNG  467
R._flav._FD-1                PELSEKNVDILRAAV-----SD-TKKDNLYSDEA---A-RLWSIFKEK--FLGFCDKIVV  471
tpg|DBYI01000091.1|          EERSRENVNYLRSTL-----ND-EQKDAFYEEEG---K-RLWSENRKK--FIYFCDNINK  471
                                                  **           :   *

037_-_emb|OIZA01000315.1|    KGNKLFKEK---------------------IIIKKEYIEDVSIDKNIYDFTKVIFFMTCF  513
emb|OCTW011587266.1|         TKSNIFKMK---------------------TPLDKALIENIKVNSDASDFCKLIYVFTRF  464
k87_11092736                 AEQNRPVFPNELR-------------NNRDIRNVRSEWLEATQDVDAAAFVQLIAFLCNF  475
```

FIG. 18DD

【図18EE】

```
BMZ-11B_GL0037915            DIKNAAAQS----------------------LDDVNLDSVTVEKEKEFPVVKLLAFLCNF  462
BMZ-11B_GL0037771            KYILKYKDA-------------------KTPGDFEDWITSKISEDDGEPFVKVLSFLCNF  464
BMZ-11B_GL0069617            DFTVFTTEK-----------------------VPADTSKEPFLSSANTEPLVKLLAFLCNF  438
Ga0099364_10024192           YFTKKEKEIT--K-------------TAQFVLSTSSIAHTSKKITQFSSFAKLLAFLCNF  508
530373_GL0023589             SIQKQENEDKLTKR-------------IDQSIIDKAVPHFVNSRDLSYFAKVVYVVASF  513
emb|ODAI011611274.1|         AVDFGSAVKGIKARSS----------VAGDKRFAEWLEEVRIRPEGVSCFTKLMYLLTRF  534
EMG_10003641                 KDLFADLVKSNKNEKQK------------FKNEYEELLKPFMIPVKVDYFSELIYLVTRF  535
CasR_P1E0_metageno           GKKLQDKDK-KKSDELGLSRDVLDGVLFR--------FAQQGSRANADYFCRLMHLSTWF  483
emb|OIZX01000427.1|          PENLSRLSGQKRKGELSLDDAMLKECLYE---PGPVPEDAAPEEANAEYFCRMIYLATLF  517
160582958_gene49834          IPSLSKDE---------------LKQMEMTKNTELLSSIETISTQASLFSEMIFMMTYL  562
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|  RILSEMDERRNKKVNQESSDTDKEEPL-----DSEIAEGITFIKETAHSFSEMIYLLTVF  543
emb|OGNF01009141.1           KIIGNMQPDSTI----------------TASMLHNTGKDWHPISENAHYFTKWIYYTLTF  489
Ga0129306_1000735            VVKGR-------------TKLNKLKLSADESTLVRNAIDGVRISPRASYFTKLIYLMTLF  516
MH0288_GL0082219             VTLSNNTPGSIKIKELALSKYDRDLVENAIDSAVDERGRRLKITDEASYFSKLIYLLTLF  576
PIG-022_GL0026351            ---------------SVKSKYGKLELDKQTINQLKRAVDDISINTKGDYFTKLMYLISLL  474
PIG-028_GL0185479            ---------------LVKSKYGKLELDTQTVNQLKRAVDDISINTKGDYFTKLMYLISLL  476
250twins_35838_GL0110300     QYKTKFKSEFKGGI----------------SIENMQQQNILLQTENIDYFSKYVLFLTKF  525
PIG-014_GL0226364            EKEKKKEFSS---------------------KTKIDLRSVQKIEDQNASVFAKMVYLISRF  471
250twins_36050_GL0158985     EKRNKFRSKV---------------------ALPDVSGAAYMLSSENIDYFVKMLFFVCKF  526
emb|OJMM01002900.1|          ESLSKFKGYK-------------------DIDESLISRYGITVANTDTLVKILYFLCKF  498
emb|OGPN01002610.1|          ELVPVKVEGKNDFQ--Q---------FTHGKLGKKEIESFCLSDKNTSDIAKVVYFLCNF  547
emb|OHCP01000044.1|          EARGIIIPGKEDPV--K---------FSHGKLDKKEIESFCLTTKNTEDITKVIYFLCKF  535
PIG-046_GL0077813            EAKGVIVPDKEEAV--K---------FSNGALDKSEIERFCITSANTDSVAKIIYFLCKF  540
pig_chimera                  EAKDVIVPDKKKPV--K---------FSHGKLDKNEIERFCITSANTDSVAKIIYFLCKF  542
```

FIG. 18EE

【図１８ＨＨ】

FIG.18HH

【図１８ＩＩ】

FIG.18II

【図１８ＪＪ】

FIG.18JJ

【図１８ＫＫ】

FIG.18KK

【図１８ＬＬ】

FIG. 18LL

【図１８ＭＭ】

FIG. 18MM

【図１８ＮＮ】

FIG. 18NN

【図１８ＯＯ】

FIG. 18OO

【図１８ＰＰ】

FIG.18PP

【図１８ＱＱ】

FIG.18QQ

【図１８ＲＲ】

FIG.18RR

【図１８ＳＳ】

FIG.18SS

【図18VV】

```
pig_chimera                          ----------LPSYGEMRKILLKKLHDFSIKGFLDEIVLL--S---------DLDM  761
emb|OIEN01002196.1|                  ----------SEGITIDEQIKKLTGIIVDMNIDSFENINNGEIGMR------Y---SK  699
O2.UC29-0_GL0096317                  ----------NISAEDEIEKLVDIIYNFNIDELEQVNNAEIGI------HSGRKV  683
CasR_Anaerobic_dig                   ----------PNIEVRSQIDYLVKRLRSFSFEDLNDVKQKVRPG------------  737
emb|OGDF01008514.1|                  ----------SFNPDLNEKIAALSEMITTLKIDDFEDVKQNPEKNA---------NYE  723
emb|OGZC01000639.1                   ----------SWSVSEEEKINFLCKILTNMSYDQFQDVKQSGAEI------------  743
Ga0224415_10048792_chimera           ----------DIKKTIEEKIDALTDIIVNMNYDQFEKKAVIENQ---NRGKTFEEKN  694
emb|OCVV012889144.1|                 ----------RGKTVSQKLDELTKIIVNMNYDQFEQKKEIIENTRTKTKYMRYDEEQ  697
Ga0187910_10006931                   ----------YGKSVSEKIDALTKVIINMNYDQFEAKRKVIENT------------  696
R._flav_XPD_                         ----------KGKSVSEKVDALTKIITGMNYDQFDKKRSVIEDT------------  691
Ga0224415_10007274                   ----------SSKSVAEKVNALTKIITGMNYDQFDSRRNVIENT------------  674
Ga0187911_10069260                   ----------RTARTMDEKIGTLIDLIVKMDFSQFEDVQQNDRVRV-----FSDAEKK  685
Ga0187910_10015336                   ----------ITNATREEKIERLVDIIKSMNLSKVATVKQRDKQ------------  779
ODAI_chimera                         ----------INSNVLTSDDMAESLVKLVTGMDFGKIKGVRNDDR------------  762
31009_GL0034153                      ----------GIGKTEWVRELSEIITGIDYSDFLNVKQRAKS------------  667
DLF014_GL0011914_                    ----------SNEVDKETQIQELTDIITGIDYLDFLDVRQSYR------------  738
CasR_R._albus                        ----------NAVVDKKVRIEKLSGLIRDMKFDDFSGVKTSNKA------------  727
Ga0187910_10040531                   ----------LPRSSSREAQVDILTGIITDVNYRIFEDVPQSKKINK-----DRPD---  721
tpg|DJXD01000002.1|                  ----------IPPTSDKSAQIDVLARIISSVDYKIFEDVPQSAKINK-----DDPS---  660
CasR_E._siraeum                      ----------TALCSANKRREKLADMIAEIKFENFSDAGNYQKANV-----TS-----  726
PIG-018_GL0023397                    ----------TAICSADKRRELAEMISNISFDWFKDAGNVQRVNA-----ED-----  716
PIG-025_GL0099734                    ----------RAAYPGREAAIDDLTKIIINMKFDDFKNVKQSANV-------ED-----  731
Ga0129317_1008067_chimera            ----------RVYSTPDKARESLRDMLHNISFNDFADVKQDDRR-------A------  652
EYZ-362B_GL0088915                   ----------PSLCTHDEKIQCLSNIIMEVRYKKFCNVAQKSRD-------T------  706
```

FIG. 18VV

【図18TT】

```
emb|OCVV012889144.1|                 LIRYGDPAHLHEIAKNEAVVRFVLGRIAD--IQKKQGKDGKNQIDRYYEICVGKD-----  650
Ga0187910_10006931                   IIRYGDPAHLHEIAKNEVVVRFVLGRIAD--IQKKQGKGGKNQIDRYYEICIGNG-----  662
R._flav_XPD_                         LIRYGDPAHLHEIAKNEAVVKFVLGRIAD--IQKKQGQNGKNQIDRYYETCIGKD-----  657
Ga0224415_10007274                   LIRYGNPVHLHEIAKNEAVVKFVLGRIAD--IQKKQGQNGKNQIDRYYETCIGKD-----  640
Ga0187911_10069260                   LIRYCHPRKIRNLAGNAALIEYQLRRLPE--L----------QILRYYEACTEPIK----  642
Ga0187910_10015336                   IVRYADPKKIRKCTENNELLKFAFKDVPD--S----------QVDRYYNICVTNK-----  745
ODAI_chimera                         LVRYANTEKIAALARNETIVRFVIKKLPA--A----------QIVRYYIACNRIKEN---  727
31009_GL0034153                      LIKYSNPTNVRKFASNTNVIKFVLGTLPD--K----------QLERYYKSCGLSD-----  635
DLF014_GL0011914_                    LVKYSNPTDVRNLASNRNVVKFVLNAIPD--T----------QIDRYYKSCIQHY-----  705
CasR_R._albus                        LVKYSSADGMIKLKTNEKLIGFVLDKLPE--T----------QIDRYYESCGLD------  693
Ga0187910_10040531                   LVRYNNPHKTRMIAQNEAIVRFVLSEIPD--E----------QIRRYYDVCRDPK-----  680
tpg|DJXD01000002.1|                  LVRYNNPHKTRTLVKNPNVVKFVLEGIPE--T----------QIKRYFDVCKGQE-----  619
CasR_E._siraeum                      LVRYGNPKKIRETAKCKPAVRFVLNEIPD--A----------QIERYYEACCPKN-----  688
PIG-018_GL0023397                    LVRYGNPKKIRETAKCPPAVKFVLDGIPD--S----------QIERYYNSCFPED-----  678
PIG-025_GL0099734                    LVKYCNPKKIRKIANNEKIVKFVLGRITE--T----------QIERYYYSCNPELK----  694
Ga0129317_1008067_chimera            IVRYSNPQKIRKLANNSVVVGFVLGKLPD--A----------QIESYFNSCLPN-----  617
EYZ-362B_GL0088915                   VIKFCNPKTAGQIIRNENILRFVLQRMPQ--E----------QIERYYHACTKN-----  671
uncultured_Ru_sp                     LIKYANAQKIREVAKNEKVVMFVLGGIPD--T----------QIERYYKSCVEFP-----  677
R._flav._FD-1                        LIKFCNPENVRKIVNNTKVIEFVLKRIPD--A----------QIERYYKSCTDS------  685
tpg|DBYI01000091.1|                  VIKFCNPKNVRKLVNNTKVTEFVLKRMPE--T----------QIDRYFESCIEG------  685
                                       :.                 :  :             :  *

037_-_emb|OIZA01000315.1|            ----------PSCEEKIKLLTKKISKLNFQTLFENNK------------------  715
emb|OCTW011587266.1|                 ----------TDIQAQAKALLDCITGISFDAIKDDKHLHKS-----------KE  665
```

FIG. 18TT

【図18WW】

```
uncultured_Ru_sp                     ----------DMNSSLGVKRSELARMIKNISFDDFKNVKQQAKG----------  711
R._flav._FD-1                        ----------EMNPPTEKKITELAGKLKDMNFGNFRNVRQSAK----------  718
tpg|DBYI01000091.1|                  ----------NLNPTTEKKIEKLAEMIKNIKFEEFRNVKQKVRD-------N------  720
                                               :  :

037_-_emb|OIZA01000315.1|            ---IPNVEKERKKAIITLYFTIVYILVKNLVNINGLYTLALYFVERDGFFYKQICEKKLI  772
emb|OCTW011587266.1|                 KSPQRSADREKKKAMLTLYYTIVYIFVKQMLHINSLYTIGFFYLERDQRFIYSRAKKEN-  724
k87_11092736                         ESRAVNLEVERLKKLTTLYMSIAYIAVKSLVKVNARYFIAYSALERDLYFFNEKYGEEFR  758
BMZ-11B_GL0037915                    DEEKKNVEIERLKAVTGLYLTVAFIAIKNLVKANARYYIAYSAFERDSELLKEKLGEEEF  740
BMZ-11B_GL0037771                    NRRETAEEIERLKAITGLYLSVAYIAIKNIVKANARYYIAFAVFERDKELVKAKDAR---  741
BMZ-11B_GL0069617                    DTSNKNVKIERLKALTGLYLTVAFVAVKNLVKANARYFIAFSAFERDYGFMKSHDPD--V  722
Ga0099364_10024192                   KSATKNVEIEHLKALTGLYLTVAYIAVKNLVKANARYYIAFSIFERDYALFEKKLGKDTL  838
530373_GL0023589                     -----AVEKERLKALVGLYLSVLYRIVKSIVRINTSYTIAFAAYERDCVILNRKMGKNLY  779
emb|ODAI011611274.1|                 ---SEQEKQKYQAIVGLYLTVVYWIVKNLVNVNSRYVMAFHILERDTVLLEGKRLFVGG  828
EMG_10003641                         ----KNKEKDRSQKLIGLYITLLYEIVKNLVNINSRYNIAFQRCDNDSIMILQGQYDER-  903
CasR_P1E0_metageno                   ----DNPKKERYKALIGLYLTVLYLAVKNMVNCNARYVIAFYCRDRDTALYQKEVCWYDL  748
emb|OIZX01000427.1|                  ----ANTQKERYKAMLGLYQTVLYLAVKNLVNINARYVMAFHCVERDMFLYDGELTDPKG  780
160582958_gene49834                  --QNPNGEKARLQACVRLYLTVPYLFIKNMVNINARYVLAFHCLERDHALCFNSRKLN--  830
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|     -------KEESDKNIIRLYLTVLYLVQKNLIYVNSRYFLAFHCAERDEMLYNGETIDNNK  818
emb|OGNF01009141.1                   EKKKANAQKEKYKSIIRLYLIVCYLFFKNLVYVNSRYYSAFYNLEKDRSLFEINGELKPT  755
Ga0129306_1000735                    ----RNREKQKMMGIISLYLNVAYQIVKNLVYVNARYTMAYHCAERDTELLLNAAGEGNL  784
MH0288_GL0082219                     ----RNARKARYQGAMSLYLNVIYQIIKNMVYINSRYTLAFAKYEHDASLLLDNWVYDPY  842
PIG-022_GL0026351                    -DTPDAIDKAQKQGLISLYLTVLYLFIKNMVYVNSRYVLAFHCLERDSQLLKITSGYN--  737
PIG-028_GL0185479                    -DTPDAIDKAQKQGLISLYLTVLYLFIKNMVYVNSRYVLAFHCLERDSQLLKITSGYN--  739
```

FIG. 18WW

【図18UU】

```
k87_11092736                         ----------NSNEMVKLIEMIDRLTTEIAGFSFAVLKDKKDSIVSA----------SR  698
BMZ-11B_GL0037915                    ----------AGNGKPIKEKIKALAEKLGEFSFDLIAENRDGIIDNA----------KL  680
BMZ-11B_GL0037771                    ----------------SDTEAEIDFLVNKLSEFSFETFISNQQTILNNS------KRGFSP  684
BMZ-11B_GL0069617                    ----------SEISRKIDTLTKALTGFSFNSLFINRDKIVENT----------KL  664
Ga0099364_10024192                   ----------QHKNVSLETKIDALADYLCKYIFEKNVLKQKNGIV-L----------NT  778
530373_GL0023589                     ----------ANPNYAHMKEQLTYKLLQVQFCNFSKVSNSSHQ-------------  724
emb|ODAI011611274.1|                 ----------PDAAECVDFLAGVVNKVDFANFTDVRTGDSSK-------------  771
EMG_10003641                         ----------DQKTMEDYLVNKLTKISYTEFLNVNQKANAE-------------  848
CasR_P1E0_metageno                   ----------TGRPAQIRYLTAQIMGVRYESFTDVEQRGRG--------------  692
emb|OIZX01000427.1|                  ----------AGRAAKVEFLTDMIAAIRFDQFRDVNQKERG--------------  724
160582958_gene49834                  ----------DDVTLMRDELGKMLQSVNFEQFSRVVNKQNAK--------------  774
gi|1198542314|gb|NFIR01000008.1|     NNSNASWDADSNKRDISVSDMRKALTEKITGLNFGDFEEESKKGIR--------------  765
emb|OGNF01009141.1                   ----------YYNDGMSDKLVEAIGKINLMQFNGVIQQADRN---------MLPE  695
Ga0129306_1000735                    ----------VDRERILDTLADKLLSLRFTDFENVNQRANAE--------------  728
MH0288_GL0082219                     ----------AAKEKKVSELARFLRALSLEDFRDVEQSANAA--------------  786
PIG-022_GL0026351                    ----------GERQENINTLAKAITNFSFSAFEKVKQSANVE---------N---  680
PIG-028_GL0185479                    ----------GKRQENINTLAEAITYFSFSNFEKVKQSANVE---------N---  682
250twins_35838_GL0110300             ----------LGDAESLKGVIIEQLHAFSIKNILLSIKNM--G---------EGEY  756
PIG-014_GL0226364                    ----------FQNQTADEIRENLAKKLKNFNIGAELKTVGNL-----------SEKD  712
250twins_36050_GL0158985             ----------YASAEAMRIRLVDALSQFSVIACLDEVGGM--T---------DKEF  770
emb|OJMM01002900.1|                  ----------QANSEAMRMTLIKLLHEFSIKNVLSDVGIM--T---------ASEN  736
emb|OGFN01002610.1|                  ----------MPAVDEMRKRLLDKINQFSVRGFLDELDEIVLM---------SDEE  769
emb|OHCP01000044.1|                  ----------SSSNEEMRRELLKKLCDFSVRGFLDEIVLL--S---------EDEM  755
PIG-046_GL0077813                    ----------LPSYGEMRKILLKKLHDFSIRDFDEEIGSL--F---------D-EM  757
```

FIG. 18UU

【図18ZZ】



FIG. 18ZZ

【図18XX】

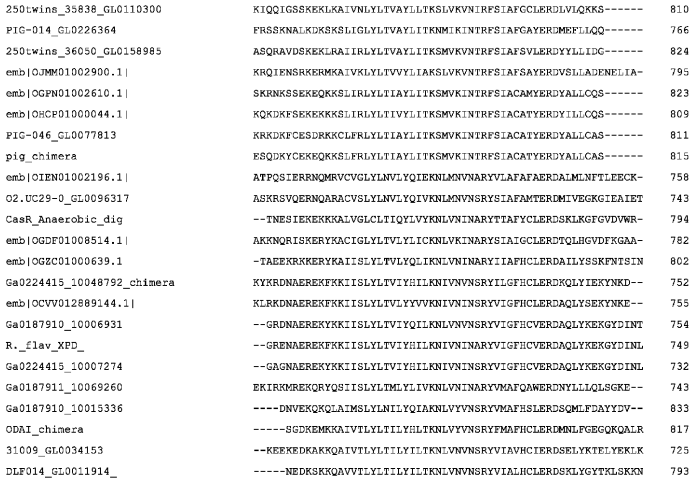


FIG. 18XX

【図18AAA】



FIG. 18AAA

【図18YY】



FIG. 18YY

【図１８ＢＢＢ】

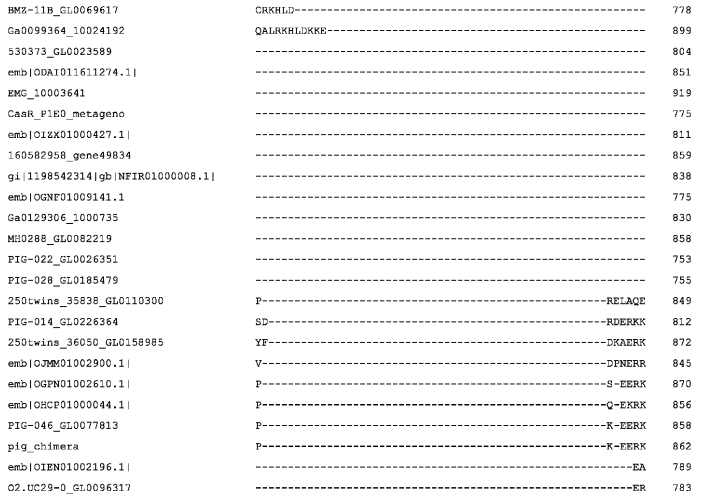


FIG. 18BBB

【図１８ＣＣＣ】



FIG. 18CCC

【図１８ＤＤＤ】



FIG. 18DDD

【図１８ＥＥＥ】



FIG. 18EEE

【図１８ＨＨＨ】



FIG. 18HHH

【図１８ＦＦＦ】



FIG. 18FFF

【図１８ＩＩＩ】

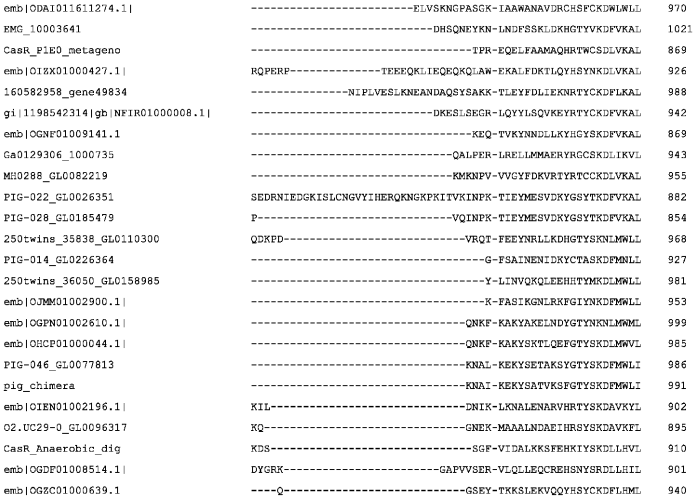


FIG. 18III

【図１８ＧＧＧ】



FIG. 18GGG

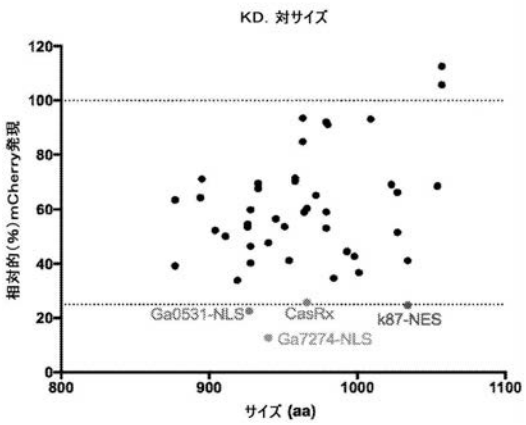
【図１８ＪＪＪ】

【図１８ＫＫＫ】

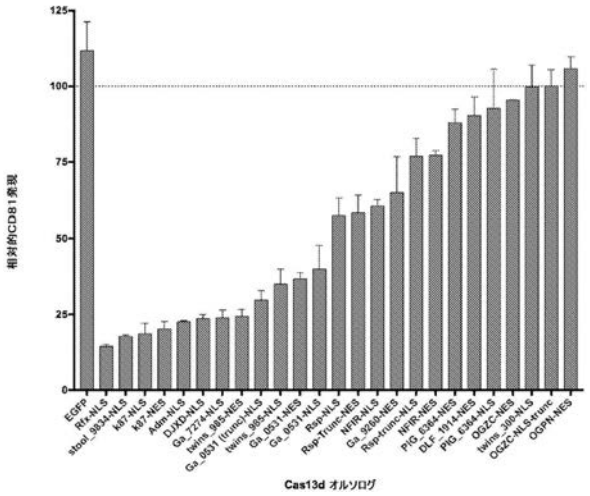
【図１８ＬＬＬ】

【図１８ＭＭＭ】

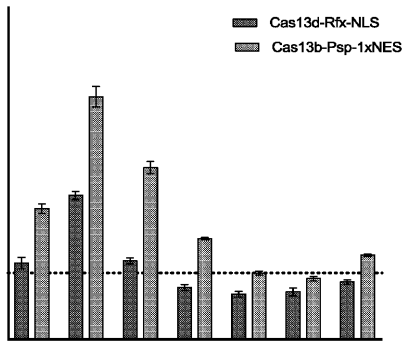
【図１９Ａ】
FIG. 19A



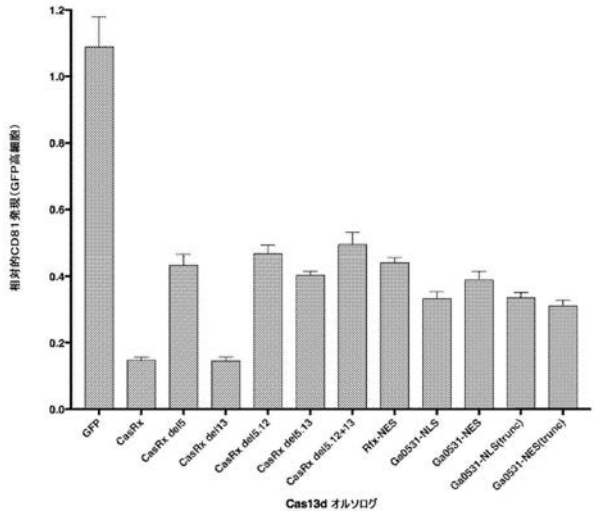
【図１９Ｂ】
FIG. 19B



【図２０】
FIG. 20

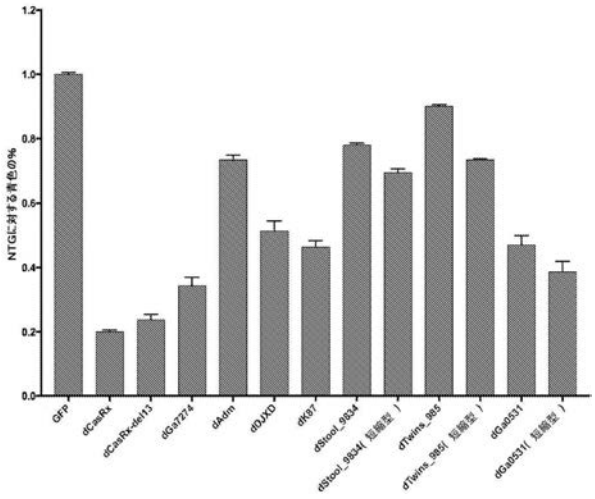


【図２１】
FIG. 21

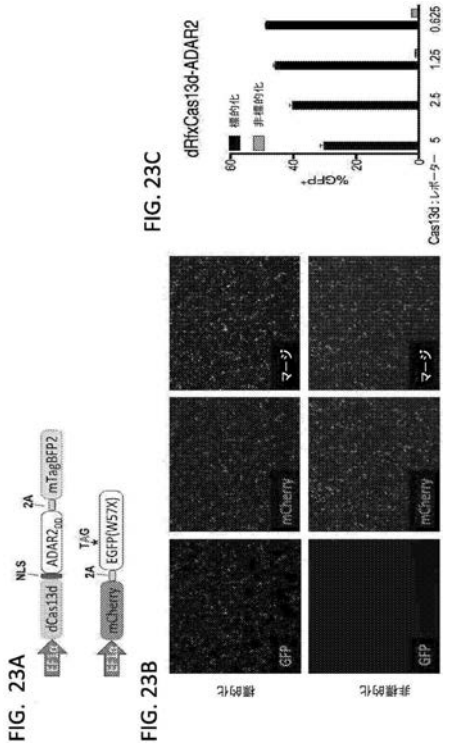


【図２２】

FIG. 22



【図２３】



【配列表】

2020532968000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/047597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/22 (2006.01) C12N 15/55 (2006.01)

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)

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

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

PATENW, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE & keywords: Cas13D, CasM, CasR, CRISPR, Ruminococcus, Eubacterium and like terms; CPC symbols: C12N9/22, C12N15/90, C12N15/52, C12N15/63, C12N2310/20, C12Y301

GENOMEQUEST: SEQ ID NOs: 1-113, 129-138, 147-170, 175-194, 196-254, 278-285, 288-296

ESPACENET, PUBMED, Internal databases: Inventor and Applicant names

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 October 2018	18 October 2018
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	**Authorised officer** Richard Filmer AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832735

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/US2018/047597
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenBank Accession no. HF545617.1 "Ruminococcus bicirculans chromosome II, complete genome", 27 February 2015. & WEGMANN, U. et al., "Complete genome of a new Firmicutes species belonging to the dominant human colonic microbiota ('*Ruminococcus bicirculans*') reveals two chromosomes and a selective capacity to utilize plant glucans", Environmental Microbiology, 2014, vol. 16, no. 9, pages 2879-2890. Protein ID: CCO06216.1	20, 21, 27-37
P,X	KONERMANN, S. et al., "Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors", Cell, 2018, vol. 173, pages 1-12, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.033, published online 15 March 2018 [retrieved from Internet on 10 October 2018] whole document	1-37
P,X	ZHANG, C. et al., "Structural basis for the RNA-guided ribonuclease activity of CRISPR-Cas13d", BioRxiv, doi: http://dx.doi.org/10.1101/314401, published 4 May 2018 [retrieved from Internet on 12 October 2018] whole document	1-37
P,X	YAN, W. X. et al., "Cas13d Is a Compact RNA-Targeting Type VI CRISPR Effector Positively Modulated by a WYL-Domain-Containing Accessory Protein", Molecular Cell, 2018, vol. 70, pages 327-339, published online 15 March 2018 whole document	1-37
E	WO 2018/183403 A1 (CARIBOU BIOSCIENCES, INC.) 04 October 2018 Abstract; [0005]-[0029]; Table 16; SEQ ID NOs: 1-48, 51, 70-165	1-22, 24-27
E	WO 2018/172556 A1 (CUREVAC AG) 27 September 2018 pages 1-3; page 78 lines 4-8 and 23-27; SEQ ID NOs: 14294-14301, 14303-14319, 14322-14329, 14331-14347, 14350-14403, 14406-14413, 14415-14431, 14434-14441, 14443-14459, 14462-14469, 14470-14487, 14490-14497, 14499-14515	1-22, 27-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/US2018/047597

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
WO 2018/183403 A1	04 October 2018	WO 2018183403 A1	04 Oct 2018
		US 2018282715 A1	04 Oct 2018
WO 2018/172556 A1	27 September 2018	WO 2018172556 A1	27 Sep 2018

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/63	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ 1/15	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ 5/10	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		

(31)優先権主張番号 62/639,178
(32)優先日 平成30年3月6日(2018.3.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/548,846
(32)優先日 平成29年8月22日(2017.8.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 スー, パトリック ディー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０３７－１００２, ラ ホーヤ, エヌ. トーリー パインズ ロード １００１０
(72)発明者 コナーマン, シルヴァナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０３７－１００２, ラ ホーヤ, エヌ. トーリー パインズ ロード １００１０

Ｆターム(参考) 4B050 CC01 DD01 FF05E FF11E FF14E KK14 LL01 LL03
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ52 QR14 QR35 QR56 QS34 QS36 QX02
4B065 AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA31 CA44 CA46