

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6624743号  
(P6624743)

(45) 発行日 令和1年12月25日 (2019. 12. 25)

(24) 登録日 令和1年12月6日 (2019. 12. 6)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006. 01)** C 1 2 N 15/09 Z N A Z  
**C 1 2 N 15/11 (2006. 01)** C 1 2 N 15/11 Z

請求項の数 10 (全 72 頁)

|                    |                              |           |                     |
|--------------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2017-528728 (P2017-528728) | (73) 特許権者 | 598015084           |
| (86) (22) 出願日      | 平成28年7月14日 (2016. 7. 14)     |           | 学校法人福岡大学            |
| (86) 国際出願番号        | PCT/JP2016/070915            |           | 福岡県福岡市城南区七隈8丁目19番1号 |
| (87) 国際公開番号        | W02017/010556                | (74) 代理人  | 100100158           |
| (87) 国際公開日         | 平成29年1月19日 (2017. 1. 19)     |           | 弁理士 鮫島 睦            |
| 審査請求日              | 平成30年1月18日 (2018. 1. 18)     | (74) 代理人  | 100122297           |
| (31) 優先権主張番号       | 特願2015-140894 (P2015-140894) |           | 弁理士 西下 正石           |
| (32) 優先日           | 平成27年7月14日 (2015. 7. 14)     | (74) 代理人  | 100145104           |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 日本国 (JP)                     |           | 弁理士 膝舘 祥治           |
|                    |                              | (72) 発明者  | 福田 将虎               |
|                    |                              |           | 福岡県福岡市城南区七隈8丁目19番1号 |
|                    |                              |           | 学校法人福岡大学内           |
|                    |                              | (72) 発明者  | 梅野 紘充               |
|                    |                              |           | 福岡県福岡市城南区七隈8丁目19番1号 |
|                    |                              |           | 学校法人福岡大学内           |

最終頁に続く

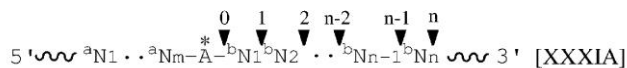
(54) 【発明の名称】 部位特異的RNA変異導入方法およびそれに使用する標的編集ガイドRNAならびに標的RNA  
 ー標的編集ガイドRNA複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 [XXXIA] :

【化1】



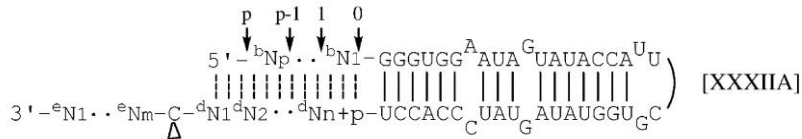
(式中、記号「 $^a\text{N}_1 \cdots ^a\text{N}_m$ 」は、5'ー標的RNAにおける末端側標的相補領域に相当し、記号「 $^a\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「m」は、40～20の塩基数を意味し、

記号「 $^b\text{N}_1^0 \text{---}^b\text{N}_2^1 \cdots ^b\text{N}_{n-1}^{n-2} \text{---}^b\text{N}_n^{n-1} \text{---}^b\text{N}_n^n$ 」は、5'ー標的RNAにおけるガイド端側標的相補領域に相当し、記号「 $^b\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「n」は、1～10の塩基数を意味し、

A\*は、標的編集部位（\*印）に存在する標的塩基アデニンを意味する。）  
 で表される5'ー標的RNAと、

式 [XXXIIA] :

## 【化 2】



(式中、記号「 $^b\text{N}_1\ ^b\text{N}_2\ \cdots\ ^b\text{N}_{p-1}\ ^b\text{N}_p$ 」は、3'一標的編集ガイドRNAのガイド側断領域に相当し、記号「 $^b\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「 $p$ 」は、10以下を意味し、

10

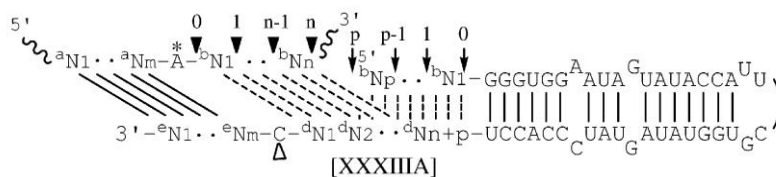
記号「 $^e\text{N}_1\ \cdots\ ^e\text{N}_m$ 」は、3'一標的編集ガイドRNAの末端側標的認識領域に相当し、記号「 $^e\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「 $m$ 」は前記と同じ意味を有し、40～20の塩基数を意味し、5'一標的RNAの末端側標的相補領域の塩基配列の塩基数と同数であり、かつ、対応する塩基同士は塩基対を形成し、

記号「 $^d\text{N}_1\ ^d\text{N}_2\ \cdots\ ^d\text{N}_{n+p}$ 」は、3'一標的編集ガイドRNAのコア側標的認識領域のC隣接部分領域とA D A R隣接部分領域の塩基配列に相当し、記号「 $^d\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「 $n$ 」はコア側標的認識領域のC隣接部分領域の塩基配列の塩基数、記号「 $p$ 」はコア側標的認識領域のA D A R隣接部分領域の塩基数を表し、C隣接部分領域の塩基配列は複合体化の際に5'一標的RNAのガイド側標的相補領域の塩基配列と塩基対を形成し、またガイド側断領域の塩基配列はA D A R隣接部分領域の塩基配列と塩基対を形成する。)

20

で表される3'一標的編集ガイドRNAと、を反応させて式 [XXXIIIA] :

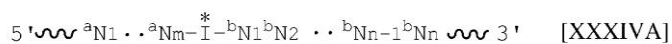
## 【化 3】



30

で表される5'一標的RNA-3'一標的編集ガイドRNA複合体を得、得られた複合体にA D A Rを作用させてRNA編集能を誘導して式 [XXXIVA] :

## 【化 4】



(式中、記号「 $^a\text{N}$ 」、記号「 $m$ 」、記号「 $^b\text{N}$ 」および記号「 $n$ 」は、式 [XXXIA] と同義である。)

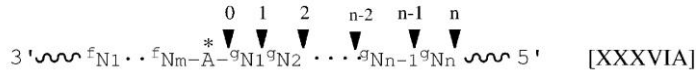
40

で表される5'一編集標的RNAを得ることにより、標的塩基アデノシン(A)をA-I編集してイノシン(I)に変換することを含み、ヒト体内の細胞内で行われることを除く、部位特異的RNA変異導入方法。

## 【請求項 2】

式 [XXXVIA] :

## 【化 5】



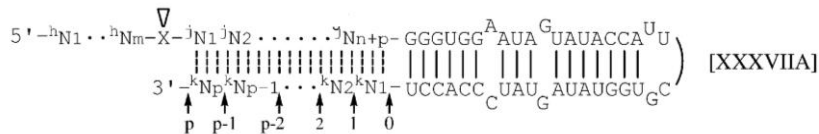
(式中、記号「 $\text{N}_1 \cdots \text{N}_m$ 」は、3' ー標的 RNA における末端側標的相補領域に相当し、記号「 $\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「 $m$ 」は、40～20個の塩基数を意味し、

記号「 $\text{N}_1 \text{N}_2 \cdots \text{N}_{n-1} \text{N}_n$ 」は、3' ー標的 RNA におけるガイド端側標的相補領域に相当し、記号「 $\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「 $n$ 」は、1～10個の塩基数を意味し、

A\*は、標的編集部位(\*印)に存在する標的塩基アデニンを意味する。)で表される 3' ー標的 RNA と、

式 [XXXVIA] :

## 【化 6】



(式中、Xはシトシン、グアニンまたはアデニンであって、記号「 $\text{N}_1 \text{N}_2 \cdots \text{N}_{n+p}$ 」は、5' ー標的編集ガイド RNA のガイド側分断領域に相当し、記号「 $\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「 $p$ 」は、10以下を意味し、

記号「 $\text{N}_1 \cdots \text{N}_m$ 」は、5' ー標的編集ガイド RNA の末端側標的認識領域に相当し、記号「 $\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「 $m$ 」は前記と同じ意味を有し、40～20の塩基数を意味し、3' ー標的 RNA の末端側標的相補領域の塩基配列の塩基数と同数であり、かつ、対応する塩基同士は塩基対を形成し、

記号「 $\text{N}_1 \text{N}_2 \cdots \text{N}_{n+p}$ 」は、5' ー標的編集ガイド RNA のコア側標的認識領域の X 隣接部分領域と A D A R 隣接部分領域の塩基配列に相当し、記号「 $\text{N}$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「 $n$ 」はコア側標的認識領域の X 隣接部分領域の塩基配列の塩基数、記号「 $p$ 」はコア側標的認識領域の A D A R 隣接部分領域の塩基数を表し、X 隣接部分領域の塩基配列は複合体化の際に 3' ー標的 RNA のガイド側標的相補領域の塩基配列と塩基対を形成し、またガイド側分断領域の塩基配列は A D A R 隣接部分領域の塩基配列と塩基対を形成する。)

で表される 5' ー標的編集ガイド RNA と、を反応させて式 [XXXVIIIA] :

## 【化 7】



で表される 3' ー標的 RNA - 5' ー標的編集ガイド RNA 複合体を得、得られた複合体の標的塩基アデノシン (A) を A D A R の作用により A - I 編集してイノシン (I) に変

10

20

30

40

50



【化 10】



(式中、Xはシトシン、グアニンまたはアデニンであって、記号「 $^k N 1 \ ^k N 2 \dots \dots \ ^k N p - 1 \ ^k N p$ 」は、標的編集ガイドRNAのガイド側分断領域に相当し、記号「 $^k N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「p」は、10以下を意味し、

10

記号「 $^h N 1 \dots \dots \ ^h N m$ 」は、標的編集ガイドRNAの末端側標的認識領域に相当し、記号「 $^h N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「m」は前記と同じ意味を有し、40～20の塩基数を意味し、標的RNAの末端側標的相補領域の塩基配列の塩基数と同数であり、かつ、対応する塩基同士は塩基対を形成し、

記号「 $^j N 1 \ ^j N 2 \dots \dots \ ^j N n + p$ 」は、標的編集ガイドRNAのコア側標的認識領域のX隣接部分領域とADAR隣接部分領域の塩基配列に相当し、記号「 $^j N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「n」はコア側標的認識領域のX隣接部分領域の塩基配列の塩基数、記号「p」はコア側標的認識領域のADAR隣接部分領域の塩基数を表し、X隣接部分領域の塩基配列は複合体化の際に標的RNAのガイド側標的相補領域の塩基配列と塩基対を形成し、またガイド側分断領域の塩基配列はADAR隣接部分領域の塩基配列と塩基対を形成する。)

20

で表される5'-標的編集ガイドRNAである標的編集ガイドRNA。

【請求項7】

請求項5又は6に記載の標的編集ガイドRNAであって、pが0であり、nが3である標的編集ガイドRNA。

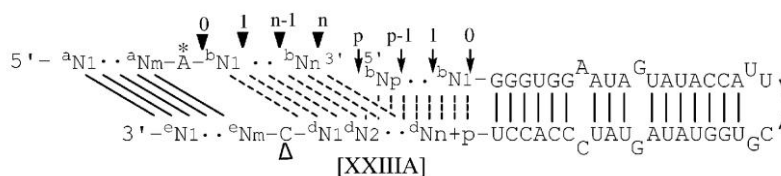
【請求項8】

請求項5から7のいずれか1項に記載の標的編集ガイドRNAと標的RNAとを複合体化し、ADARの作用によりA-I編集を誘導して該標的RNA部分の標的塩基アデノシンをイノシンに変換するための標的RNA-標的編集ガイドRNA複合体であって、

30

5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体が5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXIIIA] :

【化 11】

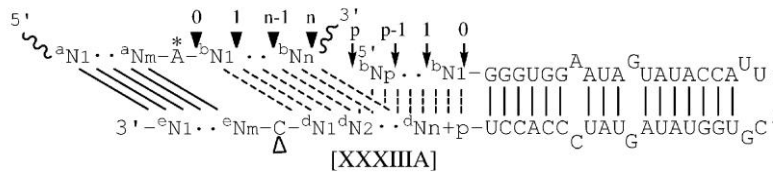


40

(式中、記号「 $^a N 1 \dots \dots \ ^a N m$ 」は、5'-標的RNAにおける末端側標的相補領域に相当し、記号「 $^a N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「m」は、40～20の塩基数を意味し、記号「 $^b N 1 \dots \dots \ ^b N n$ 」は、5'-標的RNAにおけるガイド側標的相補領域に相当し、記号「 $^b N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「n」は、1～10の塩基数を意味し、A\*は、標的編集部位(\*印)に存在する標的塩基アデニンを意味する。)

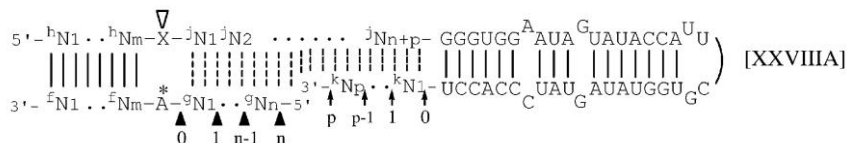
若しくは5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXXIIIA] :

## 【化 1 2】



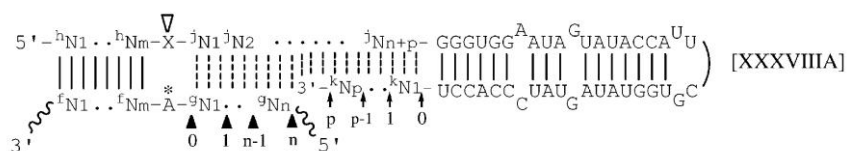
(式中、記号「 $a N 1 \cdots a N m$ 」は、5' - 標的 RNA における末端側標的相補領域に相当し、記号「 $a N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「 $m$ 」は、40～20の塩基数を意味し、記号「 $b N 1 \cdots b N n$ 」は、5' - 標的 RNA におけるガイド端側標的相補領域に相当し、記号「 $b N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「 $n$ 」は、1～10の塩基数を意味し、 $A^*$ は、標的編集部位（\*印）に存在する標的塩基アデニンを意味する。）であること、または3' - 標的 RNA - 5' - 標的編集ガイド RNA 複合体が3' - 標的 RNA - 5' - 標的編集ガイド RNA 複合体 [XXVIIIA] :

## 【化 1 3】



(式中、記号「 $f N 1 \cdots f N m$ 」は、3' - 標的 RNA における末端側標的相補領域に相当し、記号「 $f N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「 $m$ 」は、40～20個の塩基数を意味し、記号「 $g N 1 \cdots g N n$ 」は、3' - 標的 RNA におけるガイド端側標的相補領域に相当し、記号「 $g N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「 $n$ 」は、1～10個の塩基数を意味し、 $A^*$ は、標的編集部位（\*印）に存在する標的塩基アデニンを意味する。）若しくは3' - 標的 RNA - 5' - 標的編集ガイド RNA 複合体 [XXXVIIIA] :

## 【化 1 4】



(式中、記号「 $f N 1 \cdots f N m$ 」は、3' - 標的 RNA における末端側標的相補領域に相当し、記号「 $f N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「 $m$ 」は、40～20個の塩基数を意味し、記号「 $g N 1 \cdots g N n$ 」は、3' - 標的 RNA におけるガイド端側標的相補領域に相当し、記号「 $g N$ 」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からなる塩基配列を意味し、記号「 $n$ 」は、1～10個の塩基数を意味し、 $A^*$ は、標的編集部位（\*印）に存在する標的塩基アデニンを意味する。）であることを特徴とする標的 RNA - 標的編集ガイド RNA 複合体。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の標的 RNA - 標的編集ガイド RNA 複合体であって、 $p$  が 0 であり、 $n$  が 3 である標的 RNA - 標的編集ガイド RNA 複合体。

## 【請求項10】

グルタミン酸受容体mRNA前駆体 (GluR-B pre-mRNA) または編集に必要な領域のみを残して構築された人工編集基質 (miniSL RNA) を基盤として、この編集基質のADAR結合領域だけを残し、特定位置で分断することによって得られた請求項5から7のいずれか1項に記載の標的編集ガイドRNA。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、部位特異的RNA変異導入方法およびそれに使用する標的編集ガイドRNAならびに標的RNA-標的編集ガイドRNA複合体に関するものである。更に詳細には、本発明は、標的編集部位に標的塩基アデノシン (A) を有する標的RNAをADARの編集能を誘導して部位特異的にRNA変異を導入する部位特異的RNA変異導入方法およびそれに使用する標的編集ガイドRNAならびに標的RNA-標的編集ガイドRNA複合体に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞内標的遺伝子機能ならびに／もしくは発現を調節する遺伝子工学技術は、生命に関わる生物学上の現象の基礎研究ばかりではなく、医学や治療への応用に関する研究においても広く使用されている (非特許文献1)。これらの方法を使用する一つの目的は、生物学的方法に関係する細胞内タンパク質の機能を調節することである。最近では、いくつかの進化した遺伝子編集技術によって標的遺伝子情報が望むように操作できるようになった (非特許文献1、2、3、4、5)。プログラム可能な調節に加えて、遺伝子改変の最も重要な特長は、標的の細胞内遺伝子に永久的な変化をもたらすことができる点である。この永久的な効果は標的タンパク質の特徴を効率的に抑制することができる一方、かかる方法はもし誤りが発生すれば健康に危険を及ぼすことになる (非特許文献6)。

## 【0003】

生物の生命現象を担う分子は生体内のタンパク質である。通常、その生体内のタンパク質は、DNAから転写されたメッセンジャーRNA (mRNA) の情報を基に翻訳され合成される。合成されたタンパク質は、生体内の化学反応、構造形成、情報伝達、運動、抗体、栄養の貯蔵・輸送などの実に様々な生命活動の役割を担っている。

## 【0004】

このように合成される細胞内タンパク質が正常な生命活動を実行するためには、その細胞内タンパク質が正確な構造を有すると共に、正常な生理機能を発揮しなければならない。タンパク質は、DNAのゲノム情報が自己複製し、その塩基 (ヌクレオチド) 配列がRNAポリメラーゼの作用によりmRNAに転写され、リボソームによりアミノ酸に翻訳されて合成される。RNAポリメラーゼは、DNA二重鎖の一方の鎖 (アンチセンス鎖: 5'→3') を鋳型として、そのDNA上を移動しながらDNAの塩基配列をコピーしながら相補的に塩基対合する4種のヌクレオチド (A: アデノシン、U: ウリジン、G: グアノシン、C: シチジン) を重合してmRNAを合成する。この転写によって、アンチセンス鎖のDNA塩基配列に相補的に塩基対合する塩基が取り込まれて、mRNAがセンス鎖 (3'→5') として伸長合成される。

## 【0005】

以前は、タンパク質の1次構造は全てゲノムDNAが決定すると信じられていて、RNAは、そのゲノムDNAの情報を正確に写し取り、忠実にタンパク質の情報に置き換えていたと考えられていた。しかし、この遺伝情報の流れ (セントラルドグマ) に反する現象が、トリパノソーマ (原鞭毛虫類) のキネトプラスチドDNAの転写過程において、ウリジン (U) の挿入や欠失により、そこで作成されたタンパク質の1次構造が変わっていることが見出された。その後、このような現象が、植物のミトコンドリアや葉緑体のmRNA、粘菌のミトコンドリアmRNA、ウィルスmRNA、哺乳動物のmRNAなどで次々と見つかった。つまり、RNAポリメラーゼの作用によるDNAからmRNAへの遺伝情報の転写においても、そのDNA塩基配列の本来転写されるべき特定のDNA塩基配列が異なる塩基に置換されたり、または異なる塩基が挿入されたり、また本来の塩基が欠失したりしてRNA変異が発生する「RNA編集 (RN

A editing)」といわれる現象が知られている。このようにDNAからRNAへの転写によりRNA変異が生じれば、当然のことながら、その変異RNAに基づいて合成されるタンパク質は、本来生ずべきタンパク質とはその構造や機能などが異なり、機能不全を起こし疾病の病因にもなりかねない。

#### 【0006】

哺乳動物の脳に存在するRNAは、しばしばアデノシンが脱アミノ化されイノシンに変換されることが知られている。イノシンは化学構造上グアノシンと類似しており、シトシンとの塩基対形成が可能であるため、イノシン化修飾によりコドンが変化しアミノ酸配列が編集される。このようなイノシン化修飾は脳や神経系の細胞で多いことが知られており、修飾の欠損が、様々な精神神経疾患や癌などで観測されている。

10

#### 【0007】

従って、細胞内タンパク質の発現量変化や機能の不全が、疾患の分子レベルでの原因であることは明らかである。つまり、これら細胞内タンパク質の変調を正すことが可能な技術は、医療・創薬技術の基盤として極めて重要である。

#### 【0008】

DNAと対照的に、mRNAは一過性の細胞内分子である。mRNAは、遺伝子情報を保有していて、コードされたタンパク質の機能と発現量を決定している。従って、RNA標的遺伝子操作は、遺伝子情報に損傷を与える危険がなく、遺伝子編集と類似した標的タンパク質の機能を制御することが可能である。細胞内RNAを標的にし、タンパク質の発現を制御するためには、small interference RNA (siRNA) (非特許文献7) やマイクロRNA (miRNA) (非特許文献8) などの短鎖RNAが一般的に用いられている。これらの短鎖RNAは細胞内RNAサイレンシング機構を利用しているため(非特許文献9)、標的RNA分解は、いかなる外来性タンパク質の過発現なしに短鎖RNAを単に発現または導入することによって効率的に行うことができる。siRNAやmiRNAなどのこれら短鎖RNAは、その単純な構造と使い勝手の良さのために、標的遺伝子ノックダウンの分子ツールとして一般化されていて、核酸医薬としても応用されている(非特許文献10)。RNA干渉技術とは対照的に、RNAヌクレオチド配列を修飾できるRNA変異誘発(mutagenesis)技術は、生命科学研究における汎用的な遺伝子変異導入ツールとしてばかりではなく、創薬の基本的技術となる大きな潜在性を有しているにも関わらず、未だ一般的な方法は確立していない。

20

#### 【0009】

近年、ゲノム編集技術は目覚ましい発展を遂げ、高効率かつ特異的にDNAの情報を自在に改変できるようになってきた(非特許文献11)。一方で、ゲノム編集により遺伝子組換えを施した細胞は、その変異が恒常的に残ってしまうため、医療や創薬においては倫理的な問題も含め多くの解決すべき課題が残っているのも事実である。これら問題点を解決し、細胞内タンパク質機能制御を可能にする一つの方法として、RNAに変異を導入する方法が挙げられる。

30

#### 【0010】

生体内RNA編集機構の一つとして、DNAから転写されたRNAが二本鎖特異的アデノシンデアミナーゼ(ADAR: adenosine deaminases acting on RNA)によって、特定のアデノシンがイノシンに変換されるA-I編集(A-to-I RNA editing)機構が、ほぼ全ての高等生物に広く存在する転写後修飾機構である(非特許文献12、13、14)。このA-I編集の重要な役割の一つが、変換されたイノシンが翻訳機構によるグアノシンと読み取りされる転写レベルでの遺伝子情報の再コードである。従って、A-I編集は、標的タンパク質の特定のコードを変換することによってさまざまなタンパク質の機能を強力に制御できることである。

40

#### 【0011】

近年のトランスクリプトーム解析の結果、ヒト細胞内RNA上に20,000以上の編集部位が同定され(非特許文献15)、A-I編集は様々な生命現象に関わっていると考えられている。RNA中のイノシンは、タンパク質合成の際にはグアノシンとして翻訳されるため、RNA編集によってゲノム情報とは異なる情報(機能)を持つタンパク質が合成される。つまり

50

、ADARは細胞内でRNAに変異を導入していることになる。

#### 【0012】

シュードウリジル化 (psuedouridylation) (非特許文献16)や2'-ヒドロキシメチル化 (非特許文献17) のような細胞内リボソームRNA (rRNA) 修飾は、ガイドRNA (gRNAs) である小さな核小体RNA (small nucleolar RNAs; snoRNA) と特異的酵素から構成されたリボタンパク質によって処理される (非特許文献18)。これらのリボタンパク質において、gRNAは、そのアンチセンス配列との単純なワトソン-クリック塩基対合によって修飾酵素を標的に向かってガイドする重要な役割を果たしている。従って、修飾活性は、そのgRNAの人工アンチセンス配列を変換するだけで変えることができる (非特許文献19、20、21)。つまり、gRNAは標的RNA修飾を効果的に制御することができる。

10

#### 【0013】

ADARファミリータンパク質のアイソフォームであるヒトADAR2 (hADAR2) は、生体内のさまざまな細胞種において発現している。hADAR2は、2個の二重鎖RNA結合ドメイン (dsRBDs) とデアミナーゼドメインとからなっていて、単鎖RNAではなく、二重鎖RNA (dsRNA) に局在するアデノシンを優先的に標的とする (図21a)。ADARタンパク質はリボタンパク質ではなく、その自身のdsRBSを介して標的RNAに直接結合する。したがって、天然のADAR酵素を特異的な反応に仕向けることは、これまではgRNA手法では不可能と考えられていた。今日では、高機能な人工編集酵素 (エディターゼ; editase) が開発され、SNAPタグ (SNAP-tag) 技術 (非特許文献22、23、24) またはRNA-ペプチド結合モチーフ (非特許文献25) によって人工gRNAをADARの修飾デアミナーゼドメインに繋いでいる。これらのエディターゼは、細胞内での部位特異的A-I編集によって標的タンパク質の機能を調節することには成功している。しかしながら、これらRNA変異導入技術には、外来性タンパク質が必要であり、汎用性及び一般性を考慮すると未だ技術的な困難さが残っている。また、修飾デアミナーゼドメインの残留編集活性がホメオスタシスを維持する本来の編集状態に対して悪影響を及ぼす可能性を有していることから、ヒトに応用すれば健康リスクを増大させる恐れがある。つまり、修飾ADARタンパク質を使用しない、すなわち外来性タンパク質を使用せず、gRNAのみで合目的なRNA編集誘導を達成できる方法論の開発が、一般的に応用可能なRNA変異誘発方法を確立するカギとなる。

20

#### 【0014】

これまで、ADAAR変異体タンパク質とガイドRNAの人工的な複合体を用いて、標的部位特異的にRNA変異を導入する方法が開発されている (非特許文献26)。これら方法論は、標的RNAの認識にはガイド領域と呼ばれる相補的なRNA領域を使い、変異導入にはADARの活性ドメインを用いることを原理としており、任意の標的RNAに対して適用可能な画期的な方法である。しかしながら、これら従来方法には改変したADARタンパク質が必須であり、変異導入を行う際には煩雑な操作が必要になるという短所がある。

30

#### 【0015】

そこで、本発明者らは、細胞内の内在性ADARを用いて、このRNA編集の原理を利用し、細胞内ADARを自在に誘導してガイドRNAのみで標的部位特異的にRNA変異を導入することができれば、任意の細胞内標的RNAに対して部位特異的なRNA変異導入を可能にする新たな方法を開発できるのではないかと考えに至った。

40

#### 【0016】

かかる新たな方法を開発すべく鋭意研究の結果、本発明者らは、生体内でADAR2により特異的に編集されるグルタミン酸受容体mRNA前駆体 (GluR-B pre-mRNA) (非特許文献27) 及び、編集に必要な領域のみを残して構築された人工編集基質 (miniSL RNA) (非特許文献28) を基盤として、この編集基質のADAR結合領域だけを残し、特定位置で分断することによって標的編集ガイドRNAと標的RNAに分離できることを見いだした。つまり、本設計で構築した標的編集ガイドRNAは、ADAR結合領域に加え、標的RNAを認識するための相補領域を有しているため、任意の標的RNAに対して適用可能であることを見いだした。

#### 【0017】

つまり、本発明者は、この新たに見出した標的編集ガイドRNAが、細胞内で内在的に発

50

現しているADARを利用し、標的部位特異的にRNA変異を導入することが可能な機能性RNAとして設計することができることを見いだした。この設計に従い構築される標的編集ガイドRNAは、標的RNAと相補鎖を形成する「相補領域」と、天然型ADARとの結合能を有し、且つ標的塩基アデノシンに効果的に編集を誘導できるように空間的配置および配向を規定する「ADAR結合領域」で構成されていることから、この標的編集ガイドRNAを標的RNA配列に合わせて相補領域の配列を設計することで、任意の細胞内RNAに対して、標的部位特異的なA-I変異を導入する標的編集ガイドRNAを構築できることを見いだして、本発明を完成した。

#### 【0018】

さらに、本発明者らは、hADAR2をガイドすることによってA-I編集を直接誘導するADARガイドRNA (AD-gRNA) を開発した (図21a)。この手法を使用すると、特定の部位における特異的なhADAR2編集活性が、プログラム可能なアンチセンス配列により誘導される。また、部位特異的なRNA変異誘発が、hADAR2発現細胞に化学合成したAD-gRNAを直接細胞導入する方法に加え、AD-gRNAを発現するプラスミドDNAをトランスフェクトする方法でも達成できる。このAD-gRNA戦略は、設計が単純なうえ、使い勝手がよく、RNA変異誘発の一般的アプローチの基盤技術となると考えられる。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0019】

【非特許文献1】 Heidenreich M, Zhang F. Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 17, 36-44 (2016)

【非特許文献2】 Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1156-1160 (1996).

【非特許文献3】 Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* 23, 967-973 (2005).

【非特許文献4】 Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol* 29, 149-153 (2011).

【非特許文献5】 Mali P, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826 (2013).

【非特許文献6】 Araki M, Ishii T. Providing Appropriate Risk Information on Genome Editing for Patients. *Trends Biotechnol* 34, 86-90 (2016).

【非特許文献7】 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (2001).

【非特許文献8】 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355 (2004).

【非特許文献9】 Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655 (2009).

【非特許文献10】 Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 4, e252 (2015).

【非特許文献11】 (a) Cho, S. W.; Kim, S.; Kim, J. M.; Kim, J. S., Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 2013, 31 (3), 230-2; (b) Mali, P.; Yang, L.; Esvelt, K. M.; Aach, J.; Guell, M.; DiCarlo, J. E.; Norville, J. E.; Church, G. mRNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013, 339(6121), 823-6.

【非特許文献12】 Bass BL. RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* 71, 817-846 (2002).

【非特許文献13】 Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR d

10

20

30

40

50

eaminases. *Annu Rev Biochem* 79, 321-349 (2010).

【非特許文献14】Wulff BE, Nishikura K. Substitutional A-to-I RNA editing. *WIREs RNA* 1, 90-101 (2010).

【非特許文献15】Peng, Z.; Cheng, Y.; Tan, B. C.; Kang, L.; Tian, Z.; Zhu, Y.; Zhang, W.; Liang, Y.; Hu, X.; Tan, X.; Guo, J.; Dong, Z.; Bao, L.; Wang, J., Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nat Biotechnol* 2012, 30 (3), 253-60.

【非特許文献16】Ganot P, Bortolin ML, Kiss T. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89, 799-809 (1997).

【非特許文献17】Cavaille J, Bachellerie JP. SnoRNA-guided ribose methylation of rRNA: structural features of the guide RNA duplex influencing the extent of the reaction. *Nucleic Acids Res* 26, 1576-1587 (1998).

【非特許文献18】Weinstein LB, Steitz JA. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Curr Opin Cell Biol* 11, 378-384 (1999).

【非特許文献19】Cavaille J, Nicoloso M, Bachellerie JP. Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* 383, 732-735 (1996).

【非特許文献20】Zhao X, Yu YT. Targeted pre-mRNA modification for gene silencing and regulation. *Nat Methods* 5, 95-100 (2008).

【非特許文献21】Karijovich J, Yu YT. Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature* 474, 395-398 (2011).

【非特許文献22】Stafforst T, Schneider MF. An RNA-deaminase conjugate selectively repairs point mutations. *Angew Chem Int Ed Engl* 51, 11166-11169 (2012).

【非特許文献23】Schneider MF, Wettengel J, Hoffmann PC, Stafforst T. Optimal guideRNAs for re-directing deaminase activity of hADAR1 and hADAR2 in trans. *Nucleic Acids Res* 42, e87 (2014).

【非特許文献24】Vogel P, Schneider MF, Wettengel J, Stafforst T. Improving site-directed RNA editing in vitro and in cell culture by chemical modification of the guideRNA. *Angew Chem Int Ed Engl* 53, 6267-6271 (2014).

【非特許文献25】Montiel-Gonzalez MF, Vallecillo-Viejo I, Yudowski GA, Rosenthal JJ. Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18285-18290 (2013).

【非特許文献26】Vollmar W, et al. RNA editing (R/G site) and flip-flop splicing of the AMPA receptor subunit GluR2 in nervous tissue of epilepsy patients. *Neurobiol Dis* 15, 371-379 (2004).

【非特許文献27】Lomeli, H.; Mosbacher, J.; Melcher, T.; Hoyer, T.; Geiger, J. R.; Kuner, T.; Monyer, H.; Higuchi, M.; Bach, A.; Seeburg, P. H., Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* 1994, 266(5191), 1709-13.

【非特許文献28】Pokharel, S.; Beal, P. A., High-throughput screening for functional adenosine to inosine RNA editing systems. *ACS Chem Biol* 2006, 1 (12), 761-5.

【非特許文献29】Nurpeisov V, Hurwitz SJ, Sharma PL. Fluorescent dye terminator sequencing methods for quantitative determination of replication fitness of human immunodeficiency virus type 1 containing the codon 74 and 184 mutations in reverse transcriptase. *J Clin Microbiol* 41, 3306-3311 (2003).

【非特許文献30】Pokharel S, Beal PA. High-throughput screening for functional adenosine to inosine RNA editing systems. *ACS Chem Biol* 1, 761-765 (2006).

10

20

30

40

50

【非特許文献 3 1】Gommans WM, McCane J, Nacarelli GS, Maas S. A mammalian reporter system for fast and quantitative detection of intracellular A-to-I RNA editing levels. *Anal Biochem* 399, 230-236 (2010).

【非特許文献 3 2】Fukuda M, Kurihara K, Yamaguchi S, Oyama Y, Deshimaru M. Improved design of hammerhead ribozyme for selective digestion of target RNA through recognition of site-specific adenosine-to-inosine RNA editing. *RNA* 20, 392-405 (2014).

【非特許文献 3 3】Hanswillemenke A, Kuzdere T, Vogel P, Jekely G, Stafforst T. Site-Directed RNA Editing in Vivo Can Be Triggered by the Light-Driven Assembly of an Artificial Riboprotein. *J Am Chem Soc* 137, 15875-15881 (2015).

【非特許文献 3 4】Stefl R, et al. The solution structure of the ADAR2 dsRBMRNA complex reveals a sequence-specific readout of the minor groove. *Cell* 143, 225-237 (2010).

【非特許文献 3 5】Dabiri GA, Lai F, Drakas RA, Nishikura K. Editing of the GLuR-B ion channel RNA in vitro by recombinant double-stranded RNA adenosine deaminase. *EMBO J* 15, 34-45 (1996).

【非特許文献 3 6】Yeo J, Goodman RA, Schirle NT, David SS, Beal PA. RNA editing changes the lesion specificity for the DNA repair enzyme NEIL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20715-20719 (2010).

【非特許文献 3 7】Keegan LP, Leroy A, Sproul D, O'Connell MA. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs): RNA-editing enzymes. *Genome Biol* 5, 209 (2004).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

したがって、本発明の目的の 1 つの形態は、ゲノム DNA から mRNA への転写の際に発生した標的 RNA 中の標的塩基アデノシン (A) を、二本鎖特異的アデノシンデアミナーゼ (ADAR: adenosine deaminases acting on RNA) の作用により RNA 編集能を誘導して A-I 編集しイノシン (I) に変換することからなる部位特異的 RNA 変異導入方法を提供することである。

【0021】

本発明は、この別の形態として、A-I 編集したイノシン (I) をさらにグアノシン (G) に翻訳することからなる部位特異的 RNA 変異導入方法を提供することも目的としている。

【0022】

本発明は、別の形態として、標的 RNA 中の RNA 変異を ADAR 酵素の作用により RNA 編集する部位特異的 RNA 変異導入方法に利用される標的編集ガイド RNA を提供することを別の目的としている。

【0023】

本発明は、さらに別の形態として、標的 RNA 中の標的塩基アデノシンを RNA 編集する部位特異的 RNA 変異導入方法において、ADAR が RNA 編集するために固定されて RNA 編集能を誘導する基盤として作用する標的 RNA-標的編集ガイド RNA 複合体を提供することを別の目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0024】

上記目的を達成するために、本発明は、1 つの形態として、RNA 編集対象の標的 RNA 中の標的塩基アデノシン (A) を、ADAR を作用させて RNA 編集能を誘導し A-I 編集によりイノシン (I) に変換することからなる部位特異的 RNA 変異導入方法を提供する。

【0025】

具体的には、本発明は、RNA 編集対象となる RNA 変異を有する標的 RNA を標的編集ガイド RNA と反応させて二本鎖構造を有する標的 RNA-標的編集 RNA 複合体を得、ADAR 酵素を作用さ

10

20

30

40

50

せてRNA編集能を誘導しA-I編集によってRNA編集対象の標的塩基アデノシン（A）をイノシン（I）に変換することからなる部位特異的RNA変異導入方法を提供する。

【0026】

本発明はまた、A-I編集により変換されたイノシン（I）をさらにグアノシン（G）に変換することからなる部位特異的RNA変異導入方法を提供する。

【0027】

また、本発明は、別の形態として、ADAR酵素によるRNA編集を誘導してイノシンに変換する上記標的RNA－標的編集ガイドRNA複合体を構築するために、RNA編集対象の標的塩基アデノシンを有する標的RNAと相補関係にある標的編集ガイドRNAを提供する。

【0028】

さらに、本発明は、別の形態として、上記標的塩基アデノシンを有する標的RNAと該標的編集ガイドRNAと相補し二本鎖構造を構築すると共に、ADAR酵素によるRNA編集を誘導して該アデノシンをイノシンに変換する作用を有する標的RNA－標的編集ガイドRNA複合体を提供する。

【発明の効果】

【0029】

本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法は、標的編集部位に存在する標的塩基アデノシンを有するあらゆる標的RNAに対し非依存かつ非特異的に応用することができるという極めて汎用性が高くかつ有用な方法である。

【0030】

また、本発明の方法は、生体内ADAR機構を利用してRNA編集を誘導できるという極めて有用でかつ利用価値の高い方法である。しかだつて、本発明の方法は、患者に投与することによって、疾病の病因であるRNA変異をA-I編集して標的塩基アデノシンをイノシンに変換しmRNAに転写し、そのイノシンはグアノシンに翻訳されることができることに加え、疾病の原因タンパク質の機能及び発現量をA-I編集により調節することができる。これにより、本発明の方法は創薬の研究開発の有用なツールとして重要な役割を果たすことが期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第1形態を示すスキーム図である。

【図2】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第2形態を示すスキーム図である。

【図3】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第1形態の別の態様を示すスキーム図である。

【図4】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第2形態の別の態様を示すスキーム図である。

【図5】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第1形態の具体的な態様を示すスキーム図である。

【図6】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第2形態の具体的な態様を示すスキーム図である。

【図7】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第1形態のより具体的な態様を示すスキーム図である。

【図8】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第2形態のより具体的な態様を示すスキーム図である。

【図9】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第1形態の別の具体的な態様を示すスキーム図である。

【図10】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第2形態の別の具体的な態様を示すスキーム図である。

【図11】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第1形態の別の好ましい具体的な態様を示すスキーム図である。

【図12】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第2形態の別の好ましい具体的な態様

10

20

30

40

50

を示すスキーム図である。

【図 1 3】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第 1 形態の特定の態様を示すスキーム図である。

【図 1 4】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第 2 形態の特定の態様を示すスキーム図である。

【図 1 5】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第 1 形態の別の特定の態様を示すスキーム図である。

【図 1 6】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第 2 形態の別の特定の具体的な態様を示すスキーム図である。

【図 1 7】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第 1 形態の別の特定の具体的な態様を示すスキーム図である。

10

【図 1 8】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第 2 形態の別の特定の具体的な態様を示すスキーム図である。

【図 1 9】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第 1 形態の別の特定の具体的な態様を示すスキーム図である。

【図 2 0】本発明の部位特異的RNA変異導入方法の第 2 形態の別の特定の具体的な態様を示すスキーム図である。

【図 2 1】部位特異的A-I編集のガイドRNAの構築を示す図である。

【図 2 2 A】ADg-GFP\_A200の配列を示す図。

【図 2 2 B】ADg-GFP\_A200の別の配列を示す図。

20

【図 2 3】AD-gRNAと標的RNAとの複合体形成を確認するためのゲルモビリティシフトアッセイ結果を示す図。

【図 2 4】修飾GluR2 RNAに基づいたフレームワークを用いたAD-gRNAの構築の説明図。(a) 基質hADAR2構造の配列ならびに予測二次構造を示す。(b) Sequence of sADg-GFP\_A200 (上部) とsADg-rGFP\_A200 (下部) の構造を示す。(c) sADg-GFP\_A200とsADg-rGFP\_A200のin vitro編集誘導活性を示す。

【図 2 5】cis型基質RNAを用いた編集特異性の分析結果を示す図。(a) eSL\_AAA RNAとeSLr\_AAA RNAの実際の配列。(b) eSL\_AAA RNAとeSLr\_AAA RNAのシーケンスクロマトグラフ図。

【図 2 6】AD-gRNA誘導RNAの隣接特異性の分析結果を示す図。

30

【図 2 7】AD-gRNA誘導RNAの特異性ならびに効率に対する追加塩基対合領域の効果を示す図。

【図 2 8】AD-gRNA誘導 RNA編集による機能性タンパク質発現調節を説明する図、Rluc-W104XからのcDNA (上部パネル)、また ADg-rRluc\_A311でin vitro編集したRluc-W104X (下部パネル) のシーケンスクロマトグラフ図。(c) はAD-gRNAで調節した活性なルシフェラーゼ発現確認。

【図 2 9】ADg-rRluc\_A311の配列を示す図。

【図 3 0】より複雑な環境下でもAD-gRNAの能力を調べた実験の説明図。(a) ADg-rRluc\_A311、Rluc-W104XならびにhADAR2を用いた、翻訳・編集反応を同時に行う実験系を示す図。(b) ADg-rRluc\_A311のA311の編集効率を示す図。上部パネルはガイドRNA なしの場合、下部パネルは ADg-rRluc\_A311を用いた場合を示す。

40

【図 3 1】部位特異的 RNA 変異誘導のためのAD-gRNAの応用と細胞内標的タンパク質発現調節の説明図。(a) はhADAR2発現細胞内単純プラスミドトランスフェクションによる部位特異的 RNA 変異誘導を示す図。(b) はtet-ADAR2細胞内ADg-GFP\_A200とADg-rGFP\_A200の特異的編集誘導活性を確認した図。(c) は細胞内コドン修復実験の説明図。

【図 3 2】tet-ADAR2細胞内ADg-GFP\_A200のRTならびに定量PCR (qPCR) 結果を示す図。

【図 3 3】tet-ADAR2細胞内でのhADAR2発現のウェスタンブロット分析結果を示す図。

【図 3 4】tet-ADAR2細胞内AD-gRNAsで誘導された編集効率を示す図。

【図 3 5】編集基質RNAの諸点での分割により生成したAD-gRNAsの編集効率を示す図。(a) はADg-RNAs生成用ヘアピン基質上の分割線を示す図。(b) は標的RNA (GFP mRNA)

50

と5'-アンチセンスADg-RNAsの配列を示す図。ADg(L3) は図 2 4 で使用したsADg-rGFP\_A200のgRNAと同じ。(c) は各gRNAの編集誘導活性を示す図。

【図 3 6】 実験に使用した4種類の編集ガイドRNA (ADg-GFP\_A200、ADg-rGFP\_A200、sADg-GFP\_A200、sADg-rGFP\_A200) の配列を示す図。

【図 3 7】 上記編集ガイドRNAによるRNA変異導入を示す図。(a) は実験の概要を示す図。(b) はダイレクトシーケンシングによるGFP mRNAの編集解析結果を示す図。(c) はピーク高から求めたA200の編集割合を示す図。

【図 3 8】 編集ガイドRNA導入後の細胞の透過光及び蛍光顕微鏡による観察結果を示す図。

【発明を実施するための形態】

10

【0032】

本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法は、RNA編集の対象となる標的塩基アデノシン(A)を含む標的RNAまたはその特定領域に対して標的編集ガイドRNAを反応させて二本鎖複合体を形成し、形成した二本鎖複合体にADARを結合させてそのRNA編集能を誘導し標的RNA中に存在する標的塩基アデノシンをイノシンに変換することを特徴としている。このように変換されたイノシンはさらにグアノシンに翻訳される。

【0033】

そこで、本発明では、まず、標的RNAとして、RNA編集の対象となる標的塩基アデノシン(A)を含むRNAとして選定するのがよい。かかるRNAは、一般的には、自然界に存在するRNAから選択するのがよく、例えば、セロトニン受容体、グルタミン酸受容体、膜電位依

20

【0034】

RNA編集の対象とする標的RNAを選定すると、その中からRNA編集対象の標的塩基アデノシンを含む特定の領域を選定する。この特定領域を選定するに当たっては、標的編集部位を挟んで両側に所定の長さの塩基配列からなる特定領域を構築するのがよい。なお、本発明においては、この特定領域だけからなるフラグメントの他に、当然のことながら、かかる特定の領域を含む全長RNAまたは部分長RNAも使用することができる。したがって、本明細書において使用する用語「標的RNA」は、特定領域だけからなるフラグメントばかりではなく、特定領域を含む全長RNAまたは部分長RNAまたは部分長をも包含する意味で使用し

30

【0035】

このように標的RNAの特定領域を選定すれば、次に、標的編集ガイドRNAを、その特定の領域が標的RNAと実質的に対合して相補鎖を形成するように設計・構築する。かかる標的編集ガイドRNAの特定領域が設計・構築されると、その特定領域をADAR結合コア領域に結合するように設計・構築するのがよい。

【0036】

したがって、本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法は、上記のように設計・構築した標的RNAと標的編集ガイドが対応する特定領域同士相補鎖を形成し複合体化して二本鎖構造を構築し、ADARの作用によりA-I編集能が誘導され標的RNAの標的塩基アデノシンがイノシンに変換される方法である。

40

【0037】

以下に、本発明の部位特異的RNA変異導入方法の形態について添付図面を参照にして具体的に説明する。なお、以下に説明する本発明の方法は、本発明を実施するための最良の形態を説明するものであって、本発明をいかなる意味においても限定する意図で説明するものではないことを付言する。

【0038】

本発明は、RNA編集の対象となる標的RNAの配列様式により大きく2つの形態に分類することができる。第1形態は5'-標的RNAと表示する配列様式であり、第2形態は3'-標的RNAと表示する配列様式である。「5'-標的RNA」とは、RNA編集対象である標的RNAの

50

標的塩基アデノシン（A）の左側に（添付図面に対して）5'末端が存在する標的標的RNAを意味する。また、「3'-標的RNA」とは、RNA編集対象である標的塩基アデノシン（A）の左側に（添付図面に対して）3'末端が存在する標的RNAを意味する。なお、本明細書においては、「5'-標的RNA」ならびに「3'-標的RNA」について、厳密に区別して使用せずに単に標的RNAと表示する場合もある。

#### 【0039】

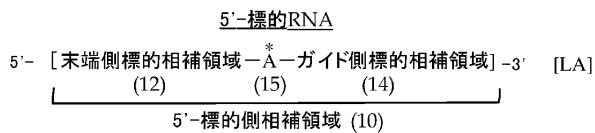
そこで、本発明の第1形態ならびに第2形態による部位特異的RNA変異導入方法について図1ならびに図2を参照してそれぞれ説明する。

#### 【0040】

第1形態による本発明の部位特異的RNA変異導入方法は、式[LIA]：

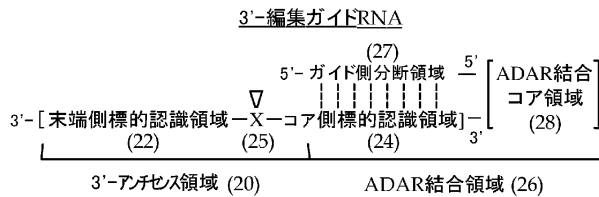
10

#### 【化1】



で表される5'-標的RNAと、式[LIA]：

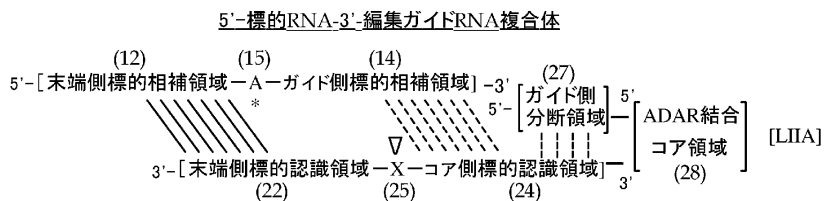
#### 【化2】



20

で表される3'-標的編集ガイドRNAを反応させ、式[LIIA]：

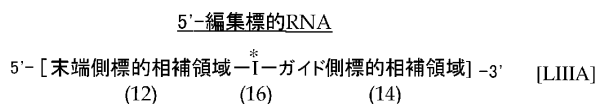
#### 【化3】



30

で表される5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体を得ると共に、ADARを作用させてA-I編集を誘導し、式[LIIIA]：

#### 【化4】



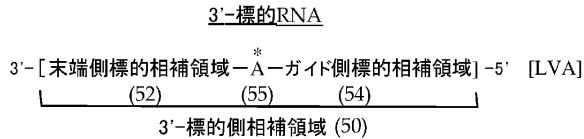
40

で表される5'-編集標的RNAに変換し、該複体の標的塩基アデノシン（A）（黒三角印）を脱アミノ化してイノシン（I）に変換することを特徴とする。このように変換されたイノシンはグアノシンに翻訳される。以下、説明を簡単にするために、この形態の方法を第1標的編集スキームともいう。

#### 【0041】

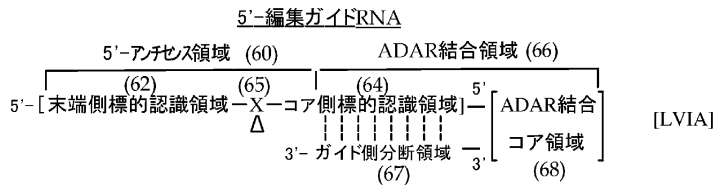
第2形態による本発明の部位特異的RNA変異導入方法は、第1形態による部位特異的RNA変異導入方法と実質的には同じであり、式[LIVA]：

## 【化 5】



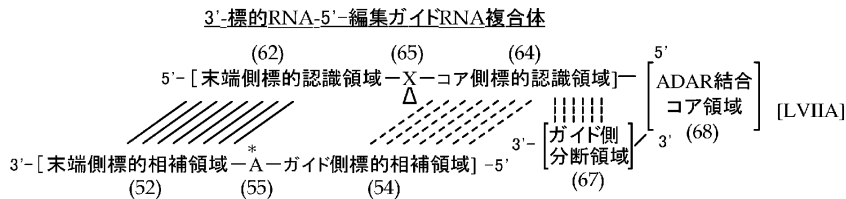
で表される 3'-標的RNAを、式 [LVIA] :

## 【化 6】



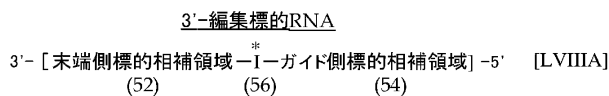
で表される 5'-標的編集ガイドRNAと反応させ、式 [LVIIA] :

## 【化 7】



で表される 3'-標的RNA-5'-標的編集ガイドRNA複合体を得、ADARを作用させてA-I編集を誘導して式 [LVIIIA] :

## 【化 8】



で表される 3'-編集標的RNAに変換して、該複体の標的塩基アデノシン (A) (黒三角印) を脱アミノ化してイノシン (I) に変換することを特徴とする。このように変換されたイノシンはグアノシンに翻訳される。以下、説明を簡単にするために、この形態の方法を第2標的編集スキームともいう。

## 【0042】

本発明に使用される第1形態の5'-標的RNA [LA] は5'-標的側相補領域 (10) からなり、その5'-標的側相補領域 (10) は、末端側標的相補領域 (12) と、ガイド側標的相補領域 (14) と、A\* (15) で表される標的塩基アデノシン (A) とから構成されている。同様に、第2形態の3'-標的RNA [LVA] は3'-標的側相補領域 (50) からなり、その3'-標的側相補領域 (50) は、末端側標的相補領域 (52) と、ガイド側標的相補領域 (54) と、A\* (55) で表される標的塩基アデノシン (A) とから構成されている。

## 【0043】

本発明において、標的RNAの末端側標的相補領域 (12, 52) は、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からそれぞれ構成される塩基配列であって、その塩基数は、特に限定されないが、一般的には40個、好ましくは30個、より好ましくは20個程度の塩基配列からなるように構築するのがよい。

## 【0044】

10

20

30

40

50

標的RNAのガイド側標的相補領域（14、54）は、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からそれぞれ構成される塩基配列であって、その塩基数は、特に限定されないが、1～15個、好ましくは1～12個、より好ましくは1～10個、特に好ましくは1～5個程度の塩基配列からなるように構築するのがよい。なお、いずれの標的RNAのガイド側標的相補領域の塩基配列も、後述する編集ガイドRNAと複合体化するに際しては、編集ガイドRNAのコア側標的認識領域のX隣接部分の塩基配列とそれぞれ塩基対を形成するように構築する。

#### 【0045】

標的RNAにおいて、A\*（15、55）は、標的編集部位（\*印）に存在する標的編集対象の標的塩基アデノシンをそれぞれ意味する。

10

#### 【0046】

本発明において、標的編集ガイドRNAは、アンチセンス領域（20、60）と、ADAR結合領域（26、66）とから構成される。アンチセンス領域（20、60）は、第1形態の5'-標的RNAまたは第2形態の3'-標的RNAと相補鎖をそれぞれ形成するように構築する。

#### 【0047】

さらに、3'-標的編集ガイドRNAの3'-アンチセンス領域（20）は、末端側標的認識領域（22）と、コア側標的認識領域（24）のX隣接部分領域と、5'-標的RNAの標的塩基アデノシンを標的編集誘導する標的編集誘導塩基X（25）（△印）とから構成される。

20

#### 【0048】

同様に、5'-標的編集ガイドRNAの5'-アンチセンス領域（60）は、末端側標的認識領域（62）と、コア側標的認識領域（64）のX隣接部分領域と、3'-標的RNA [LV A] の標的塩基アデノシン（A）を標的編集誘導する標的編集誘導塩基X（65）（△印）とから構成される。

#### 【0049】

本発明の標的編集ガイドRNAの末端側標的認識領域（22、62）は、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であって、その塩基数は、特に限定されないが、一般的には、40個程度、好ましくは30個程度、より好ましくは20個程度の塩基配列から構成される塩基領域をそれぞれ構築するのがよい。ただし、この構成塩基数は、対応する標的RNAの末端側標的相補領域（12、52）の塩基数と同数であって、それぞれ対応する塩基同士が対合し塩基対を形成するようにそれぞれ構築する。

30

#### 【0050】

またアンチセンス領域のコア側標的認識領域のX隣接部分領域は、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であって、塩基数が、一般的には1～15個以内、好ましくは1～12個以内、より好ましくは10個以内、特に好ましくは1～5個程度の塩基配列からなる塩基配列を構成するとともに、標的RNAのガイド側標的相補領域の塩基配列とそれぞれ塩基対を形成する。このコア側標的認識領域のX隣接部分の塩基配列は、標的RNAと複合体を形成する際、そのガイド側分断領域の塩基配列と塩基対合して塩基対を形成するように構築する。

40

#### 【0051】

また、アンチセンス領域に隣接するADAR結合領域は、コア側標的認識領域のADAR隣接部分領域とADAR結合コア領域とガイド側分断領域とからなり、それぞれアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であって、コア側標的認識領域のADAR隣接部分領域とガイド側分断領域のそれぞれの塩基数は、一般的には0～10個、好ましくは5個程度の塩基配列からなる塩基領域を意味し、それぞれの構成塩基は互いに塩基対合して塩基対を形成するように構築する。

#### 【0052】

本発明において、ADARがA-I編集誘導能を発揮できるためには、ADAR結合領域の塩基配

50

列は大きく修飾することなく、ある特定の塩基配列またはそれに類似する塩基配列にある程度固定することも可能である。一方、編集ガイドRNAのアンチセンス領域の塩基配列は、目的とする標的塩基Aを含む標的RNAはその塩基配列は千差万別であり、極めて多様な塩基配列を有していることから、その塩基配列の種類や長さも自由に変えることができるように構築する必要がある。また、編集ガイドRNAのアンチセンス領域の塩基配列の塩基数、特にそのコア側標的認識領域のX隣接部領域の塩基配列の塩基数を増減することによって、ADARのA-I編集能を調節することができる可能性がある。

#### 【0053】

また、ADAR結合コア領域（28、68）は、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基からそれぞれ構成されるステムループ構造をした不完全2重鎖RNA構造をしている。このステムループ構造は、ループ構造を挟んで2本の不完全相補塩基配列構造をしていて、各一本鎖の塩基配列は、同種または異種の塩基配列であり、その塩基数は、編集誘導能を損なわない限り特に限定されないが、一般的には10～40個、好ましくは20～30個程度であるのがよい。また、ループ構造は、対応する構成塩基同士は互いに相補鎖を形成せず、同種および異種の4個～8個、好ましくは4～5個の塩基から構成されている。さらに、この不完全相補二本鎖の一方の一本鎖の塩基配列は、その末端がコア側標的認識領域のADAR隣接部分と、また他方の一本鎖の塩基配列は、その末端がガイド側分断領域にそれぞれ結合した構造になっている。

#### 【0054】

さらに、ADAR結合コア領域は、ADARが結合することによりADARの作用を誘導する領域であって、標的RNAの標的塩基アデノシンをA-I編集してイノシンに変換する機能を有している。つまり、ADARによるRNA編集は、ADARが標的編集ガイドRNAのADAR固定コア領域に固定されることによりADARのRNA編集能を誘導する機能を発揮することができる。なお、A-I編集能を有するADARとしては、例えば、ADARとしては、例えば、hADAR1、hADAR2が挙げられる。

#### 【0055】

本発明において、標的RNAと標的編集ガイドRNAが相補して複合体化することにより標的RNA-標的編集ガイドRNA複合体が形成される。具体的には、標的RNAの標的側相補領域と、標的編集ガイドRNAのアンチセンス領域の1部であるコア側標的認識領域のX隣接部分塩基配列が塩基対合して相補鎖を形成することによって標的RNA-標的編集ガイドRNA複合体が形成される。更に具体的には、標的RNAの末端側標的相補領域と標的編集ガイドRNAの末端側標的認識領域が、また標的RNAのガイド側標的相補領域と標的編集ガイドRNAのコア側標的認識領域が対合して相補鎖をそれぞれ形成することによって標的RNA-標的編集ガイドRNA複合体が形成される。

#### 【0056】

更に詳細には、本発明の第1標的編集スキームにおいては、5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [LIIA] は、5'-標的RNA [LA] の末端側標的相補領域（12）の構成塩基と、3'-標的編集ガイドRNA [LIA] の3'-末端側標的認識領域（22）の構成塩基は、対応する塩基同士が塩基対合して塩基対を形成するように構築する。

#### 【0057】

同様に、本発明の第2標的編集スキームにおいては、3'-標的RNA-5'-標的編集ガイドRNA複合体 [LIIIA] は、3'-標的RNA [LVA] の末端側標的相補領域（52）の構成塩基と、5'-標的編集ガイドRNA [LIA] の5'-末端側標的認識領域（62）の構成塩基は、対応する塩基同士が塩基対合して塩基対を形成するように構築する。

#### 【0058】

一方、該複合体 [LIIA] において、5'-標的RNA [LA] のガイド側標的相補領域（14）の構成塩基は、編集ガイドRNAのコア側標的認識領域（24）のX隣接部分領域の構成塩基と塩基対を構成するとともに、そのADAR隣接部分領域の構成塩基はガイド側分断領域（27）の構成塩基と塩基対合して塩基対を形成するように構築する。

#### 【0059】

同様に、該複合体 [LVIIIA] において、3'-標的RNA [LVA] のガイド側標的相補領域 (54) は、編集ガイドRNA [LVIA] のコア側標的認識領域 (64) のX隣接部分領域の構成塩基と塩基対を構成するとともに、そのADAR隣接部分領域はガイド側分断領域 (67) の構成塩基と塩基同士対合して塩基対を形成するように構築する。

#### 【0060】

前述したように、標的編集ガイドRNAのコア側標的認識領域の塩基数は、標的RNAのガイド側標的相補領域と、標的編集ガイドRNAのガイド側分断領域の合計塩基数と同数であるように構築する。したがって、標的編集ガイドRNAのコア側標的認識領域のX隣接部分領域の塩基配列の塩基数を調節して、ADAR結合領域のガイド側分断領域の塩基配列の塩基数よりも大きく設計するのがよい。このように調節することによって、ADARによるA-I編集能を調節することができる。

10

#### 【0061】

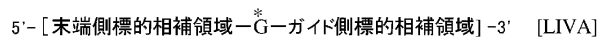
本発明において、標的RNAと標的編集ガイドRNAとが複合体化されて二本鎖構造を形成することにより、ADARが該標的編集ガイドRNAのADAR固定コア領域に作用し、RNA編集能が誘導されて、該複合体に結合した標的RNAに存在する標的塩基アデノシン (A) がA-I編集されてイノシン (I) に変換される。

#### 【0062】

さらに、上記のように標的塩基アデノシンがイノシンに変換された編集標的RNAは、そのイノシンがグアノシン (G) に翻訳される。つまり、本発明においてRNA編集された5'-標的RNAの5'-編集標的RNA [LIIIA] ならびに3'-標的RNAの3'-編集標的RNA [LVIIIA] のそれぞれのイノシン (I) は、5'-翻訳標的RNA [LIVA] :

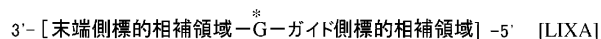
20

#### 【化9】



ならびに3'-翻訳標的RNA [LIXA] :

#### 【化10】



30

で示すようにグアノシン (G) に翻訳される。

#### 【0063】

上記標的編集スキームにおいて、標的RNAの標的塩基A (\*印) に対応する標的編集部位 (△印) に存在する標的編集誘導塩基X (25、65) としては、標的塩基Aとは相補しないシトシン (C)、グアノシン (G)、アデノシンならびにウリジンのいずれの塩基が挙げられる。なお、A-I編集能の点からすると、シトシン (C) を標的編集誘導塩基として使用するのが好ましい。

#### 【0064】

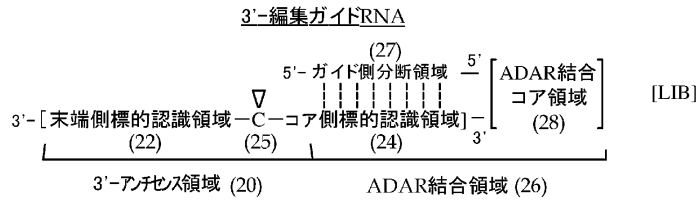
したがって、本発明は、その好ましい態様として、標的編集部位 (△印) に対応する標的編集誘導塩基 (X) を塩基シトシン (C) として構築した部位特異的RNA変異導入方法を提供する。

40

#### 【0065】

つまり、本発明の好ましい態様では、第1標的編集スキームにおける3'-標的編集ガイドRNA [LIA] において標的編集誘導塩基Xとしてシトシン (C) を使用した3'-標的編集ガイドRNA [LIB] :

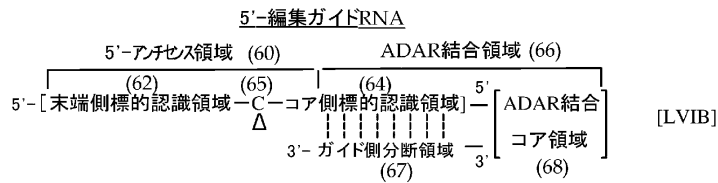
【化 1 1】



または第 2 標の編集スキームにおける 5'-標的編集ガイドRNA [LVIA] において標的編集誘導塩基 X としてシトシン (C) を使用した 5'-標的編集ガイドRNA [LVIB] :

10

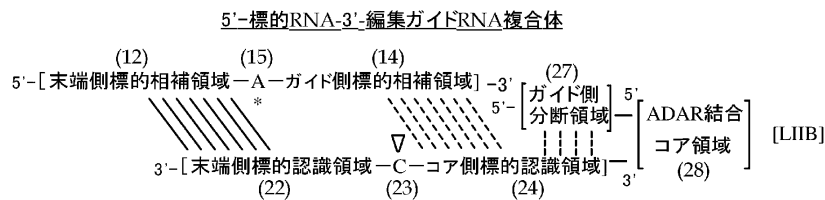
【化 1 2】



を、対応する標的RNAとそれぞれ反応させて複合体化し得られた 5'-標的RNA - 3'-標的編集ガイドRNA複合体 [LIIB] :

20

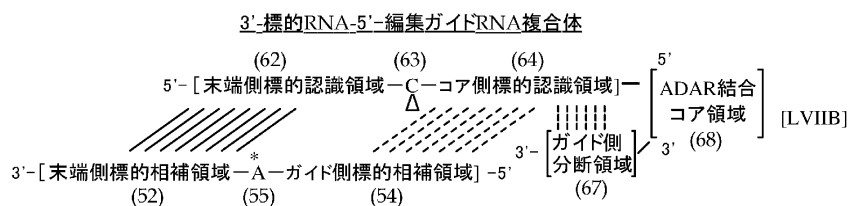
【化 1 3】



または 3'-標的RNA - 5'-標的編集ガイドRNA複合体 [LVIIB] :

30

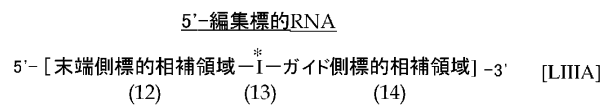
【化 1 4】



に対してADARを作用させてA-I編集を誘導して 5'-編集標的RNA [LIIIA] :

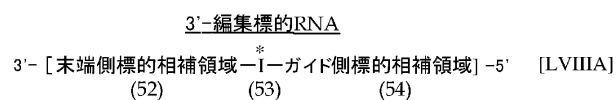
【化 1 5】

40



または 3'-編集標的RNA [LVIIIA] :

【化 1 6】



50

にそれぞれ変換し、各標的RNA部の標的塩基アデノシンをイノシンにより効率的にかつ容易に変換することを特徴としている。

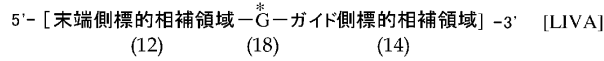
【0066】

上記のようにA-I編集された各編集標的RNAのイノシン（I）は、5'-翻訳標的RNA [LIVA] または3'-翻訳標的RNA [LIXA] に示すようにグアノシン（G）に翻訳される。

【0067】

【化17】

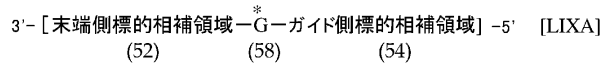
5'-翻訳標的RNA



10

【化18】

3'-翻訳標的RNA



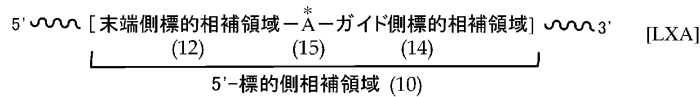
【0068】

さらに、標的RNAとして全長RNAまたは上記標的側相補領域の塩基配列より長い部分長RNAを使用した場合、本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法は、図3または図4に示すように、5'-標的RNA [LXA] :

20

【化19】

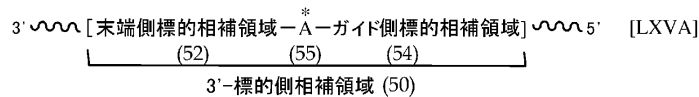
5'-標的RNA



または3'-標的RNA [LXVA] :

【化20】

3'-標的RNA

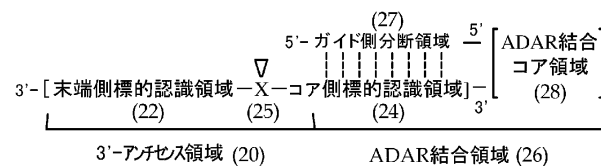


30

と、3'-標的編集ガイドRNA [LIA] :

【化21】

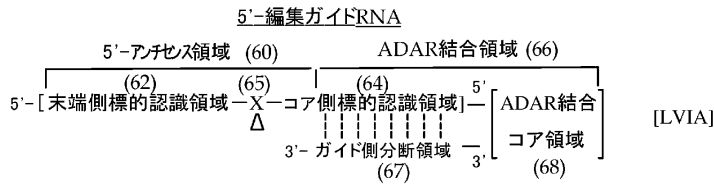
3'-編集ガイドRNA



40

または5'-標的編集ガイドRNA [LVIA] :

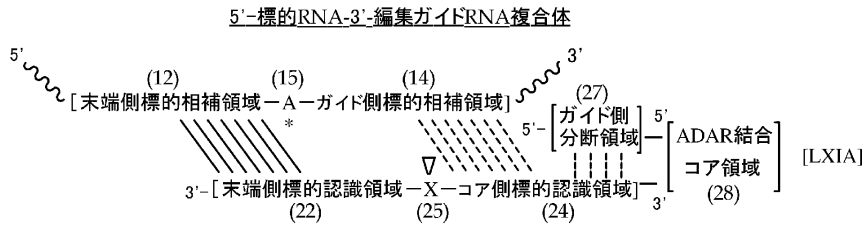
【化 2 2】



をそれぞれ反応させて 5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [LXIA] :

【化 2 3】

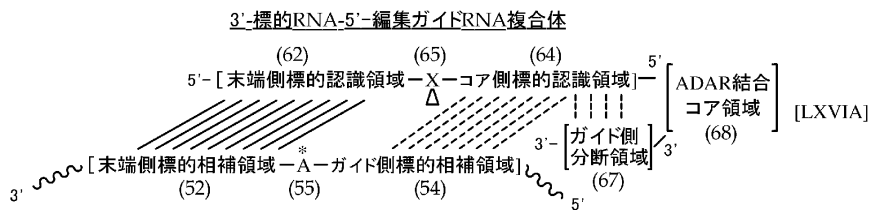
10



または 3'-標的RNA-5'-編集ガイドRNA複合体 [LXVIA] :

【化 2 4】

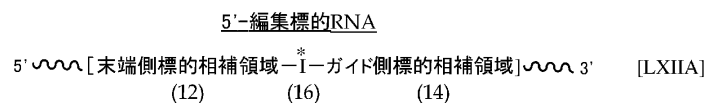
20



をそれぞれ得、ADARの作用により標的RNAのRNA変異である標的塩基アデノシンをイノシンにA-I編集した 5'-編集標的RNA [LXIIA] :

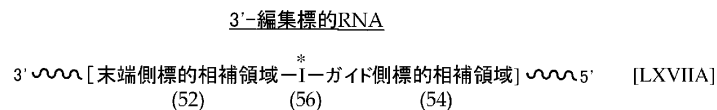
【化 2 5】

30



または 3'-編集標的RNA [LXVIIA] :

【化 2 6】



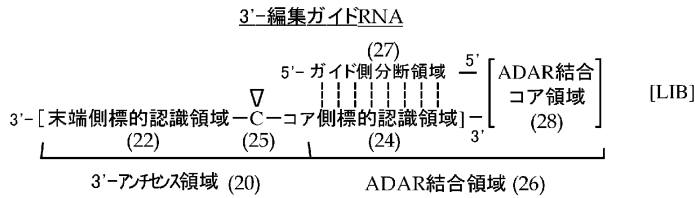
40

をそれぞれ得ることから構築される。

【0069】

同様に、本発明の好ましい態様として、対応する標的RNAの標的塩基アデノシン (A) と対応する標的編集誘導塩基 X (25、65) (△印) として、シトシン (C) を使用した部位特異的RNA変異導入方法は、第1標的編集スキームにおいて、3'-標的編集ガイドRNA [LIA] の代わりに式 [LIB] :

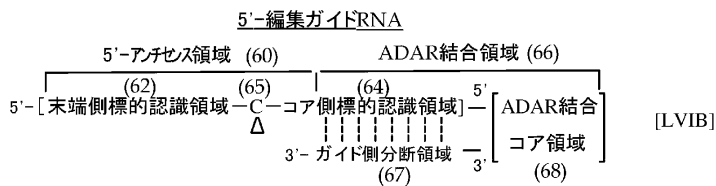
【化 2 7】



で表される 3'-標的編集ガイドRNAを使用して、または第 2 標的編集スキームにおいて、5'-標的編集ガイドRNA [LVIA] の代わりに式 [LVIB] :

10

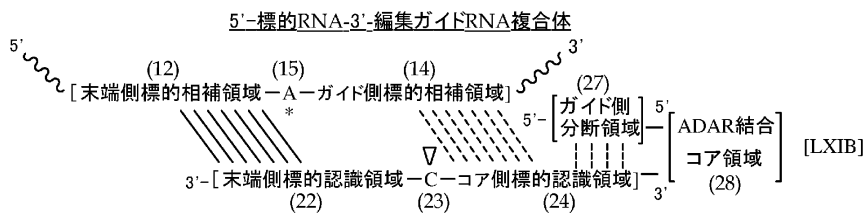
【化 2 8】



で表される 5'-標的編集ガイドRNAを使用して、対応する標的RNAとそれぞれ反応させて式 [LXIB] :

20

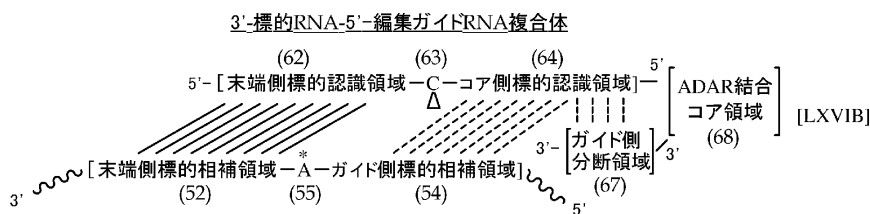
【化 2 9】



で表される 5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体または式 [LXVIB] :

30

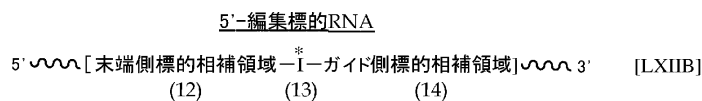
【化 3 0】



で表される 3'-標的RNA-5'-標的編集ガイドRNA複合体をそれぞれ得、各複合体にADARを作用させてA-I編集を誘導して該標的RNAの標的塩基アデノシンをイノシンに変換して式 [LXIIB] :

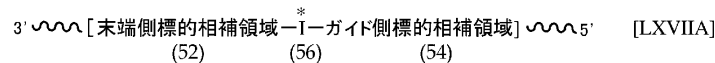
40

【化 3 1】



で表される 5'-編集標的RNAまたは式 [LXVIIA] :

【化 3 2】

3'-編集標的RNA

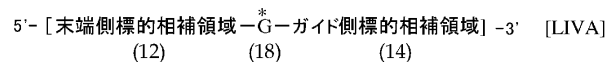
で表される 3'-編集標的RNAをそれぞれ得ることによってRNA編集対象の標的塩基アデノシンをイノシンに変換することができる。

【0070】

上記のようにイノシンに変換された編集標的RNAは、5'-翻訳標的RNA [LIVA] :

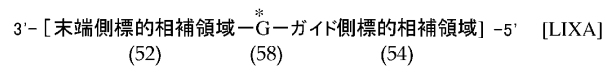
10

【化 3 3】

5'-翻訳標的RNA

または 3'-翻訳標的RNA [LIXA] :

【化 3 4】

3'-翻訳標的RNA

20

に変換されて、イノシンはグアノシンに翻訳される。

【0071】

以上のようにして、本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法は、ADARの作用により全長標的RNAまたは部分長標的RNA中に含まれる標的塩基アデノシンをA-I編集してイノシンに簡単に変換することが可能である。

【0072】

以上、本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法について包括的に説明した。以下、本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法について図面を参照してより具体的に説明する。

30

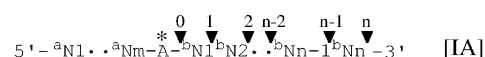
【0073】

まず、第1標的編集スキームによる本発明の部位特異的RNA変異導入方法について図5を参照して説明する。なお、図5に示す本発明の部位特異的RNA変異導入方法は、図1に示す包括的な形態をより具体的に表すものである。

【0074】

本発明の部位特異的RNA変異導入方法は、図5に示すように、5'-標的RNA [IA] :

【化 3 5】

5'-標的RNA

40

(式中、記号「 ${}^a\text{N}1 \cdot \cdot {}^a\text{N}_m$ 」は、上記5'-標的RNA [IA] の末端側標的相補領域(12)を構成する塩基配列に相当する塩基配列を表し、「 ${}^a\text{N}$ 」がアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)またはウラシル(U)から選ばれるいずれかの塩基からなる同種もしくは異種の塩基の組み合わせで構成される連続塩基配列であり、その塩基数は、特に限定されないが、一般的には40個、好ましくは30個、より好ましくは20個程度になるように構築し、

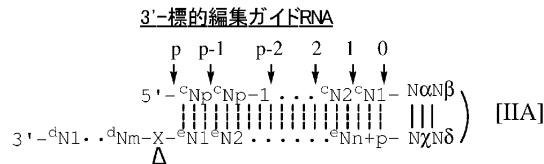
記号「 ${}^b\text{N}1 \text{---} {}^b\text{N}2 \cdot \cdot \text{---} {}^b\text{N}_{n-1} \text{---} {}^b\text{N}_n$ 」は、5'-標的RNA [IA] のガイド側標的相補領域(14

50

）を構成する塩基配列に相当する塩基配列を表し、記号「<sup>b</sup>N」がアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）またはウラシル（U）から選ばれるいずれかの塩基からなる1～15個、好ましくは12個程度、より好ましくは10個程度、特に好ましくは5個程度の同種または異種の塩基組み合わせで構成される連続塩基配列であるように構築する。）

と、3'－標的編集ガイドRNA [IIA]：

【化36】



10

（式中、記号「<sup>c</sup>N1<sup>c</sup>N2...<sup>c</sup>Np-1<sup>c</sup>Np」は、3'－標的編集ガイドRNAのガイド側分断領域（27）に相当し、記号「<sup>c</sup>N」がアデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種および異種の塩基から構成される塩基配列であり、記号「p」は、塩基数が、一般的には0～15個、好ましくは12個以下、より好ましくは10個以下を意味し、

記号「<sup>d</sup>N1...<sup>d</sup>Nm」は、3'－アンチセンス領域の末端側標的認識領域（22）を構成する塩基配列を意味し、記号「<sup>d</sup>N」がアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）またはウラシル（U）から選ばれるいずれか1種の塩基からなり、塩基数が、特に限定されないが、一般的には40個、好ましくは30個、より好ましくは20個程度になる同種または異種の塩基の組み合わせからなる連続塩基配列になるように構築するとともに、5'－標的RNAの末端側標的相補領域（12）の塩基配列の構成塩基数と同数であるとともに、その末端側標的相補領域の塩基配列と塩基対を構築し、

20

記号「<sup>e</sup>N1<sup>e</sup>N2...<sup>e</sup>Nn+p」は、記号「<sup>e</sup>N1<sup>e</sup>N2...<sup>e</sup>Nn」で表されるコア側標的認識領域のX隣接部分領域の塩基配列と、記号「<sup>e</sup>N1<sup>e</sup>N2...<sup>e</sup>Np」で表されるADAR隣接部分領域の塩基配列を意味するとともに、そのX隣接部分領域は、記号「<sup>e</sup>N」がアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）またはウラシル（U）から選ばれるいずれかの塩基からなり、塩基数が、本発明の目的ならびに機能を損なわない限り特に限定されないが、一般的には、1～15個、好ましくは1～12個、より好ましくは1～10個、特に好ましくは5個以下からなる同種または異種の塩基の連続塩基配列を表し、またそのADAR隣接部分領域は、同様に、アデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）またはウラシル（U）から選ばれるいずれかの塩基からなり、塩基数が一般的には0～15個、好ましくは12個以下、より好ましくは10個以下からなる連続塩基配列を表している。）

30

と反応させて複合体化させて5'－標的RNA－3'－標的編集ガイドRNA複合体 [IIIA]：

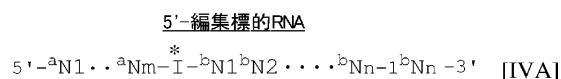
【化37】



40

を得、次いで得られた5'－標的RNA－3'－標的編集ガイドRNA複合体 [IIIA] をADARの作用によりA-I編集し5'－編集標的RNA [IVA]：

【化38】

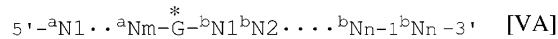


50

に変換し、標的塩基アデノシン（A）（\*印）をイノシン（I）に変換するRNA変異編集から構成される。得られた5'-編集標的RNA [IVA] は続いてそのイノシン（I）がグアノシン（G）に翻訳されて5'-翻訳標的RNA [VA]：

【化39】

5'-翻訳標的RNA



に変換される。

【0075】

ただし、5'-標的RNA [IA] において、▲印を付した番号は、標的塩基Aからの塩基「 ${}^b\text{N}$ 」の塩基数を表している。例えば、番号「0」は標的塩基Aに隣接するガイド側標的相補領域の塩基が存在しないことを意味し、また番号「1」は標的塩基Aに隣接するガイド側標的相補領域の塩基が1個存在すること、さらに番号「n」は標的塩基Aに隣接するガイド側標的相補領域の塩基がn個からなる塩基配列を意味している。以下の説明でも同じ意味を有する。

【0076】

同様に、3'-標的編集ガイドRNA [IIA] において、↓印を付した番号は、ADAR結合コア領域の1末端からの塩基「 ${}^e\text{N}$ 」の塩基数を表している。例えば、番号「0」は標的塩基Aに隣接するガイド側分断領域の塩基配列が存在しないことを意味し、また番号「1」はガイド側分断領域の塩基が1個存在すること、番号「p」はガイド側分断領域の塩基がp個からなる塩基配列を意味している。以下の説明でも同じ意味を有する。

【0077】

また、3'-標的編集ガイドRNA [IIA] において、例えば、番号が「0」である場合、ADAR結合コア領域の1末端に隣接するガイド側分断領域の塩基が存在しないことになることから、対応するコア側標的認識領域のADAR隣接部分に対応する塩基も存在しないことになる。したがって、この場合は、そのコア側標的認識領域は記号「 ${}^e\text{N}1\cdots{}^e\text{N}n$ 」で表されるそのX隣接部分領域の塩基配列だけから構成されることになる。一方、番号が「1」である場合、ガイド側分断領域の塩基数は1個になることから、コア側標的認識領域の塩基配列は記号「 ${}^e\text{N}1\cdots{}^e\text{N}n+1$ 」で表される。また、番号が「p」の場合、コア側標的認識領域の塩基配列は記号「 ${}^e\text{N}1\cdots{}^e\text{N}n+p$ 」で表される。以下の説明でも同じ意味を有する。また、例えば、番号が「1」の場合、つまり、記号「 ${}^e\text{N}1$ 」の場合、編集ガイドRNAの該当する塩基「 ${}^e\text{N}1$ 」は、標的RNAのガイド側標的相補領域の塩基「 ${}^b\text{N}1$ 」と塩基対を構成する。

【0078】

なお、編集ガイドRNAのコア側標的認識領域の構成塩基数が余り小さくなりすぎて当該標的編集ガイドRNAの3'-標的認識領域内に存在する対応塩基（X）からADAR結合コア領域までの距離が短くなり過ぎると、ADARによるA-I編集の誘導能が低下して好ましくない場合がある。また、この構成塩基数が余り大きくなりすぎて当該標的編集ガイドRNAの3'-標的認識領域内に存在する対応塩基（X）からADAR結合コア領域までの距離が長くなり過ぎても、ADARによるA-I編集の誘導能が低下して好ましくない場合がある。

【0079】

また、ADAR結合領域において、記号「 $\text{N}\alpha\text{N}\beta\text{-N}\delta\text{N}\chi$ 」は、前述したように、上記3'-標的編集ガイドRNA [LIA] ならびに5'-標的編集ガイドRNA [LVIA] のADAR結合コア領域（28、68）を構成する塩基配列に相当するステムループ構造からなる不完全二本鎖RNA構造からなっている。つまり、ステムループ構造は、ループ構造を挟んで2本の塩基配列からなり、その2本の塩基配列が、相補する塩基対と相補しないミスマッチ塩基対が混在する不完全相補の二本鎖からなる構造である。各一本鎖を構成する塩基（N）は、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる同種もしくは異種の塩基から構成され、各一本鎖の塩基数は、一般的には10～40個、好ましくは20～30個であるのがよい。また、ループ構造は、対応する構成塩基同士は互いに相補鎖を形成せず、同種お

10

20

30

40

50

よび異種の4個～8個、好ましくは4～5個の塩基から構成されている。このステムループ構造は、そのループ構造を挟んで結合する不完全相補二本鎖の一末端側は標的認識領域のADAR隣接部分領域の塩基配列と、他の末端側はガイド側分断領域の塩基配列と結合するように構築するのがよい。

#### 【0080】

記号「 $N\alpha-N\chi$ 」は、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルから選ばれる互いに同種もしくは異種の塩基で構成されるそれぞれ1本の塩基配列からなり、この塩基対は、単数個もしくは複数個、好ましくは2個ていどのミスマッチ塩基対を有する不完全2本鎖相補領域を表している。記号「 $N\beta-N\delta$ 」は、塩基数が4～8個、好ましくは4～5個の同様な同種または異種の塩基で構成されるループ構造を表している。また、記号「 $N\alpha-N\chi$ 」は、その一末端が5'ー標的RNAのガイド側標的相補領域または当該標的編集ガイドRNAのガイド側分断領域に結合し、その他の末端は当該標的編集ガイドRNAのコア側標的認識領域に結合した構造である。

10

#### 【0081】

上記5'ー標的RNAー3'ー標的編集ガイドRNA複合体 [IIIA] において、記号「 $^a N1 \cdots ^a N_m$ 」と記号「 $^d N1 \cdots ^d N_m$ 」は各構成塩基対（つまり、例えば、「 $^a N1-dN1$ 」、「 $^a N_m-dN_m$ 」）が実線で結合した状態で示されていて、各構成塩基対が相補鎖を形成していることを表している。

#### 【0082】

つまり、記号「 $^a N1 \cdots ^a N_m$ 」で表される5'ー標的RNAの末端側標的相補領域の塩基配列と、記号「 $^d N1 \cdots ^d N_m$ 」で表される3'ー標的編集ガイドRNAの末端側標的認識領域の塩基配列が互いに塩基対合し塩基対を形成するとともに、記号「 $^b N1 \cdots ^b N_n$ 」で表される5'ー標的RNAのガイド側標的相補領域の塩基配列と、記号「 $^e N1 \cdots ^e N_n$ 」で表される3'ー標的編集ガイドRNAのコア側標的認識領域のX隣接部分の塩基配列とが互いに塩基対合し塩基対を形成して複合体化する。一方、ADAR結合コア領域は、その1端がガイド側分断領域の塩基配列と、また他端がコア側標的認識領域のADAR隣接部分と結合した構造になる。

20

#### 【0083】

同様に、第2標的編集スキームによる本発明の部位特異的RNA変異導入方法について図6を参照してより具体的に説明する。なお、図中の各記号は、上記第1標的編集スキームにおける対応する各記号と実質的には同じ意味を有するところから、説明を簡潔にするために、ここでは詳しい説明は省略する。

30

#### 【0084】

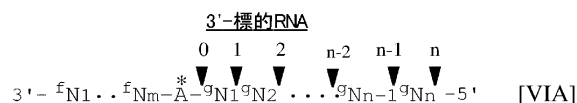
本発明によれば、5'末端部位に5'ー標的RNAが相補する3'ー標的編集ガイドRNA [IIA] の場合と同様に、その3'末端部位に3'ー標的RNAが相補する3'ー標的編集ガイドRNA [IIA] の場合も3'ー標的RNAの標的塩基アデノシンはA-I編集を受けてイノシン（I）に変換される。

#### 【0085】

第2標的編集スキームによる本発明方法の本発明方法は、図6に示すように、3'ー標的RNA [VIA] :

#### 【化40】

40



と、5'ー標的編集ガイドRNA [VIIA] :

を反応させて複合体化させて 5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [VIII A] :  
【化 4 2】

**5'-編集ガイドRNA**

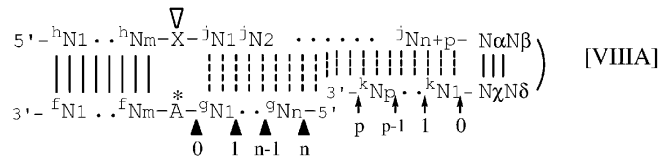
$$\begin{array}{ccccccc}
 5' - {}^{\mathrm{h}}\mathrm{N}_1 \cdots {}^{\mathrm{h}}\mathrm{N}_{\mathrm{m}} - \mathrm{X} - {}^{\mathrm{j}}\mathrm{N}_1 {}^{\mathrm{j}}\mathrm{N}_2 \cdots {}^{\mathrm{j}}\mathrm{N}_{\mathrm{n}+\mathrm{p}} - \mathrm{N}\alpha\mathrm{N}\beta & \\
 | & & & & & & \\
 3' - {}^{\mathrm{k}}\mathrm{N}_{\mathrm{p}} {}^{\mathrm{k}}\mathrm{N}_{\mathrm{p}-1} \cdots {}^{\mathrm{k}}\mathrm{N}_2 {}^{\mathrm{k}}\mathrm{N}_1 - \mathrm{N}\chi\mathrm{N}\delta & 
 \end{array}$$

)

[VIIA]

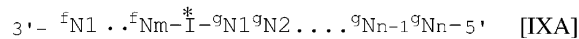
$\nabla$   
 $p \quad p-1 \quad p-2 \quad \dots \quad 2 \quad 1 \quad 0$

### 3'-標的RNA-5'-編集ガイドRNA複合体

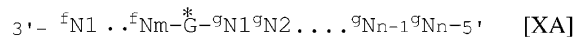


20

3'-編集標的RNA



### 3'-翻譯標的RNA



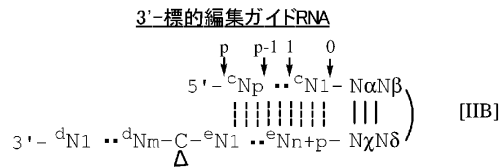
【 0 0 8 6 】

40

【 0 0 8 7 】

したがって、上記第1標的編集スキームに本発明は、図7に示すように、3'-標的編集ガイドRNA [IIA] を3'-標的編集ガイドRNA [IIB] :

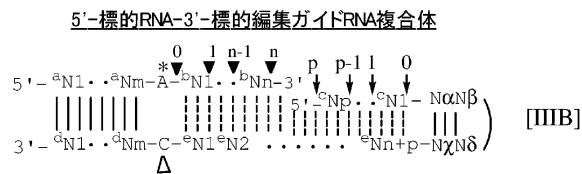
【化 4 5】



に代えて使用することにより 5'-標的RNAと複合体化させて 5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [IIIIB] :

10

【化 4 6】



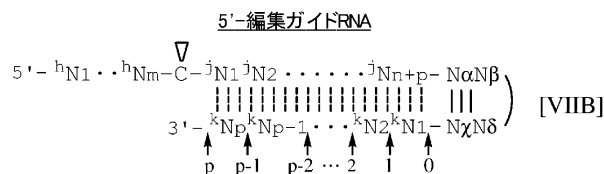
を得、ADARを作用させて 5'-標的RNAの標的塩基アデノシンをA-I編集してイノシンに変換する部位特異的RNA変異導入方法を提供する。

20

【0088】

同様に、上記第2標的編集スキームによる本発明は、図8に示すように、5'-標的編集ガイドRNA [VIIA] を 5'-標的編集ガイドRNA [VIIB] :

【化 4 7】



30

に代えて使用することにより、3'-標的RNAと複合体化させて 3'-標的RNA-5'-標的編集ガイドRNA複合体 [VIIIB] :

【化 4 8】



40

を得、ADARを作用することにより 3'-標的RNAの標的塩基アデノシンをA-I編集してイノシンに変換する部位特異的RNA変異導入方法を提供する。

【0089】

さらに、上記第1および第2標的編集スキームにおいて、本発明は、標的RNAとして標的RNAフラグメントを含む全長RNA分子または部分長RNA分子を用いた好ましい形態を構築することができる。

【0090】

つまり、第1標的編集スキームによる本発明の部位特異的RNA変異導入方法は、図9に示すように、5'-標的RNA [IA] に代えて 5'-標的RNA [XIA] :

50

【化 5 0】



【化 5 0】



【 0 0 9 1 】

10

【化 5 1】



20

【化 5 2】



30

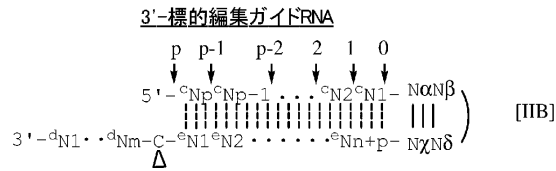
【 0 0 9 2 】

40

【 0 0 9 3 】

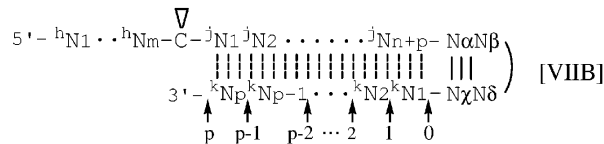
上記標的編集スキームにおいて標的編集部位に対応する部位に存在するRNA塩基（X）をシトシン（C）に構築することによって、上記第1および第2標的編集スキームによる本発明は、図11および図12にそれぞれ示すように、3'-標的編集ガイドRNA [IIA] に代えて3'-標的編集ガイドRNA [IIB] :

【化 5 3】



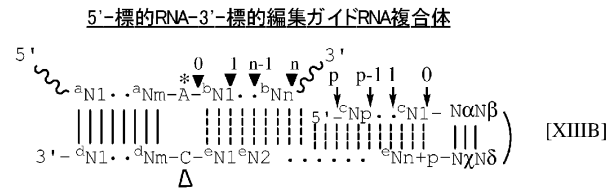
または 5'-標的編集ガイドRNA [VIIA] に代えて 3'-標的編集ガイドRNA [IIB] :

【化 5 4】



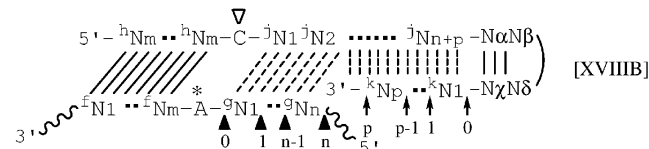
を使用することによって、5'-標的RNA [XIA] または 3'-標的RNA [XVIA] と複合体化させて 5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XIIIB] :

【化 5 5】



または 3'-標的RNA-5'-標的編集ガイドRNA複合体 [XVIIIB] :

【化 5 6】



をそれぞれ得、得られた複合体にADARを作用させることによりA-I編集能が誘導され、標的RNA側の標的塩基アデノシンがイノシンに変換され、続いてそのイノシンがグアノシンに翻訳される部位特異的RNA変異導入方法を提供する。

【0094】

本発明において使用するADAR結合領域を含む標的編集ガイドRNAは次のように設計することができる。前述したように、非特許文献7には、生体内でADAR2により特異的に編集されるグルタミン酸受容体mRNA前駆体 (GluR-B pre-mRNA) (非特許文献6) を基盤として、編集に必要な領域のみを残した編集基質RNA (miniSL RNA) が構築されている。本発明者は、この編集基質のADAR結合領域だけを残し、図示する位置で分断することによって標的編集ガイドRNAと標的RNAに分離することによって、本発明の標的編集ガイドRNAとして構築できることを見いだした。したがって、このように構築した標的編集ガイドRNAは、ADAR結合領域に加え、標的RNAを認識するための相補領域を有しているので、任意の標的RNAに対して適用可能であるため、本発明の標的編集ガイドとして利用できる。

【0095】

具体的には、本発明において、モデル標的RNAとして緑色蛍光タンパク質mRNA配列に対して、標的編集ガイドRNAを設計し、標的編集部位にA-I変異を誘導できるかどうかを確認した。そこで設計した各RNAをin vitro転写反応を用いて合成した後、精製した組換えADA

10

20

30

40

50

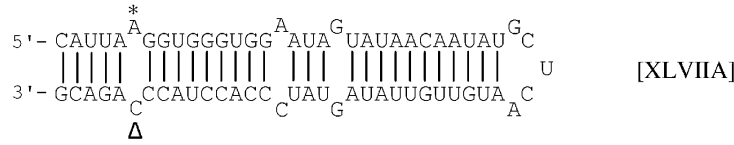
R2を用いてin vitro編集反応を行った。その結果、編集部位は標的編集ガイドRNA依存的に編集されることが分かった。この結果、このような設計により本発明の目的とする機能を有する標的編集ガイドRNAが構築できることを見いだした。

【0096】

つまり、例えば、上記グルタミン酸受容体mRNA前駆体 (GluR-B pre-mRNA) [XLVIIA]

:

【化57】

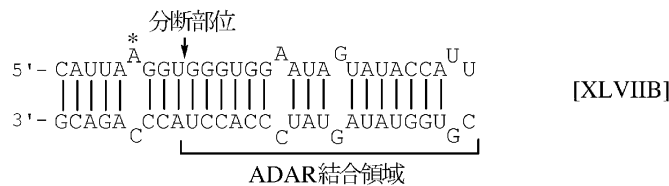


10

を基盤として編集に必要なADAR結合領域だけを残して編集基質 (miniSL RNA) [XLVIIIB]

:

【化58】



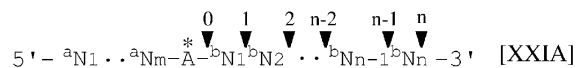
20

を構築することができる。つまり、これにより、編集基質RNA (miniSL RNA) のADAR結合領域を残して分断部位 (↓) で分断したところ、標的RNAと標的編集ガイドRNAに分離できることが明らかになった。

【0097】

そこで、ここで得られた標的編集ガイドを使用した第1標的編集スキームによる本発明の好ましい形態は、図13に示すように、5'-標的RNA [XXIA] :

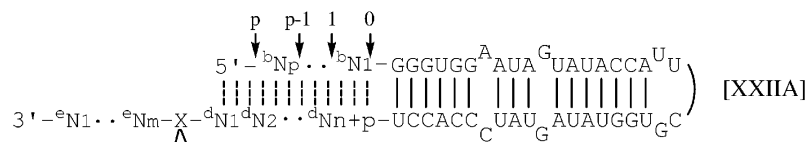
【化59】



30

を3'-標的編集ガイドRNA [XXIIA] :

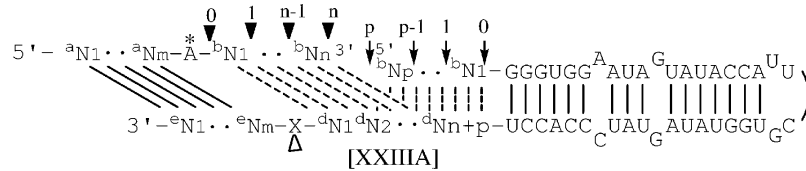
【化60】



40

と反応させて複合体化し5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXIIIA] :

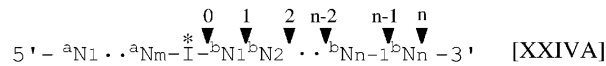
【化 6 1】



を得、得られた複合体にADARを作用させてA-I編集能を誘導し、5'-編集標的RNA [XXIVA]

10

【化 6 2】



に変換して標的塩基アデノシンをイノシンに変換する。変換されたイノシンはグアノシンに翻訳される。

【0098】

第1標的編集スキームによる本発明のより好ましい態様は、図15に示すように、3'-標的編集ガイドRNA [XXIIB] として、3'-標的編集ガイドRNA [XXIIB] :

20

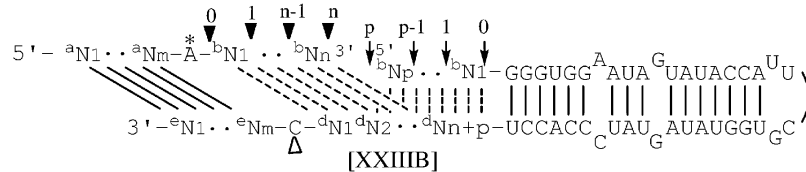
【化 6 3】



を使用して、5'-標的RNA [XXIA] と反応させて複合体化して5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXIIB] :

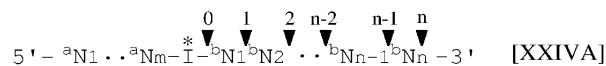
【化 6 4】

30



を得、ADARを作用させてA-I編集能を誘導して5'-編集標的RNA [XXIVA] :

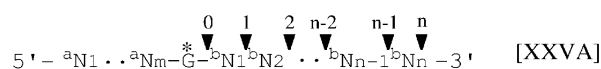
【化 6 5】



40

に示すように標的塩基アデノシンをイノシンに変換することを特徴としている。この変換されたイノシンは5'-翻訳標的RNA [XXVA] :

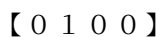
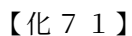
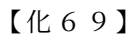
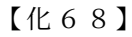
【化 6 6】



に示すようにグアノシンに翻訳される。

50

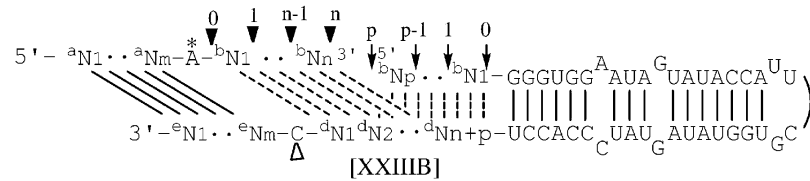
【化 6 7】



【化 7 2】

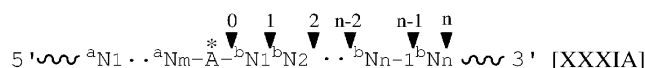


をそれぞれ使用し、5'-標的RNA [XXIA] または3'-標的RNA [XXVIA] とそれぞれ反応させて複合体化し、5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXIIIB] :  
【化74】


$$\left( \begin{array}{c} 5' - {}^h\text{N}_1 \cdot {}^h\text{N}_m - \overset{\nabla}{\text{C}} - {}^j\text{N}_1 {}^j\text{N}_2 \cdot \cdot \cdot \cdot {}^j\text{N}_{n+p} - \text{GGGUGG}^{\text{A}} \text{AUA}^{\text{G}} \text{UAUACCA}^{\text{U}} \text{U} \\ \text{|||||} \\ 3' - {}^f\text{N}_1 \cdot {}^f\text{N}_m - \overset{*}{\text{A}} - {}^g\text{N}_1 \cdot \cdot \cdot \cdot {}^g\text{N}_{n-5} - {}^3\text{N}_p \cdot {}^k\text{N}_1 - \text{UCCACC}^{\text{C}} \text{UAU}^{\text{G}} \text{AUAUGGU}^{\text{G}} \text{C} \end{array} \right) \quad [\text{XXVIII}]$$
$$5' - a_{N_1} \dots a_{N_m} - \overset{0}{\downarrow} b_{N_1} \overset{1}{\downarrow} b_{N_2} \dots \overset{2}{\downarrow} b_{N_{n-1}} \overset{n-1}{\downarrow} b_{N_n} - 3' \quad [\text{XXIV}]$$
$$3' - {}^fN_1 \dots {}^fN_m - \overset{*}{I} - {}^gN_1 {}^gN_2 \dots {}^gN_{n-1} {}^gN_n - 5', \quad [XXIXA]$$

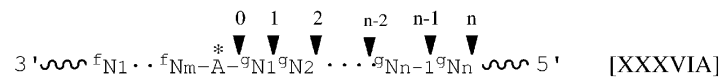
【 0 1 0 1 】

【化 7 8】



または 3'-標的RNA [XXVIA] として 3'-標的RNA [XXXVIA] :

【化 7 9】



を使用することにより、5'-標的編集ガイドRNA [XXXIIA] または 3'-標的編集ガイドRNA [XXXVIIA] と複合体化して 3'-標的RNA-5'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXXIIIA] または 3'-標的RNA-5'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXXVIIIA] をそれぞれ得、得られた複合体にADARを作用させてA-I編集能を誘導して5'-編集標的RNA [XXXIVA] または 3'-編集標的RNA [XXXIXA] に変換して標的塩基アデノシンがイノシンにそれぞれ変換され、続いて5'-翻訳標的RNA [XXXVA] または 3'-翻訳標的RNA [XXXLA] に変換され、イノシンはグアノシンにそれぞれ翻訳される。

10

【0102】

さらに、上記第1および第2標的編集スキームにおいて、標的編集部位に対応する部位の塩基(X)をRNA塩基シトシンに変えることによって、本発明のより好ましい態様の方法が提供される。

【0103】

つまり、本発明のより好ましい態様は、図19または図20に示すように、5'-標的RNA [XXXIA] または 3'-標的RNA [XXXVIA] を、3'-標的編集ガイドRNA [XXXIIA] または 5'-標的編集ガイドRNA [XXXVIIA] とそれぞれ反応させて、5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXXIIIA] または 5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XXXVIIIA] をそれぞれ得、得られた複合体にADARを作用させてA-I編集能を誘導して5'-編集標的RNA [XXXIVA] または 3'-編集標的RNA [XXXIXA] に変換して標的塩基アデノシンがイノシンにそれぞれ変換され、続いて5'-翻訳標的RNA [XXXVA] または 3'-翻訳標的RNA [XXXLA] に変換され、イノシンはグアノシンにそれぞれ翻訳される。

20

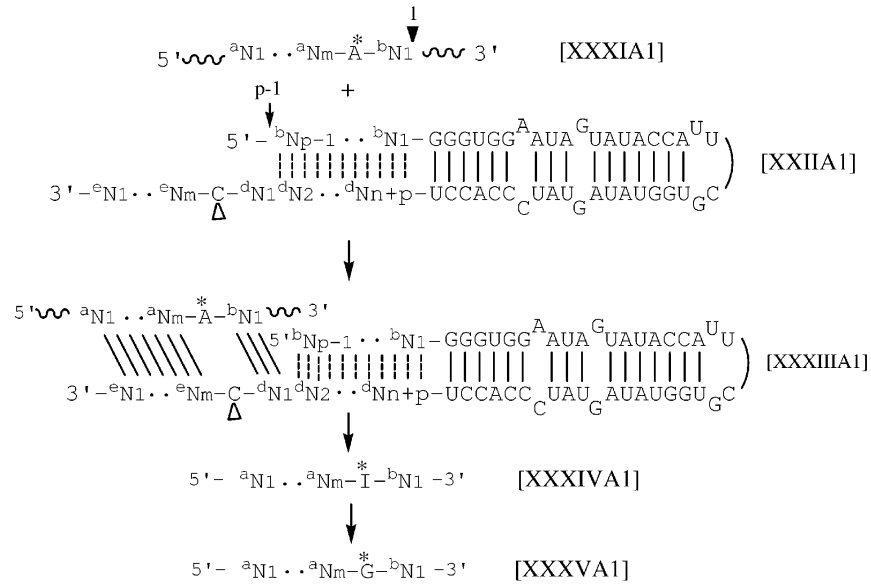
【0104】

さらに、第1標的編集スキームによる本発明のより好ましい態様は、例えば、標的RNAの各部位(黒三角印で示した)で分断したRNA分子と、それに対応する部位(同じ番号を付した矢印の位置)で分断された標的編集ガイドRNAを使用することによって標的RNAの標的塩基アデノシンをイノシンに変換することができる。他の態様も同様に適用することができる。

30

【0105】

【化 8 0】

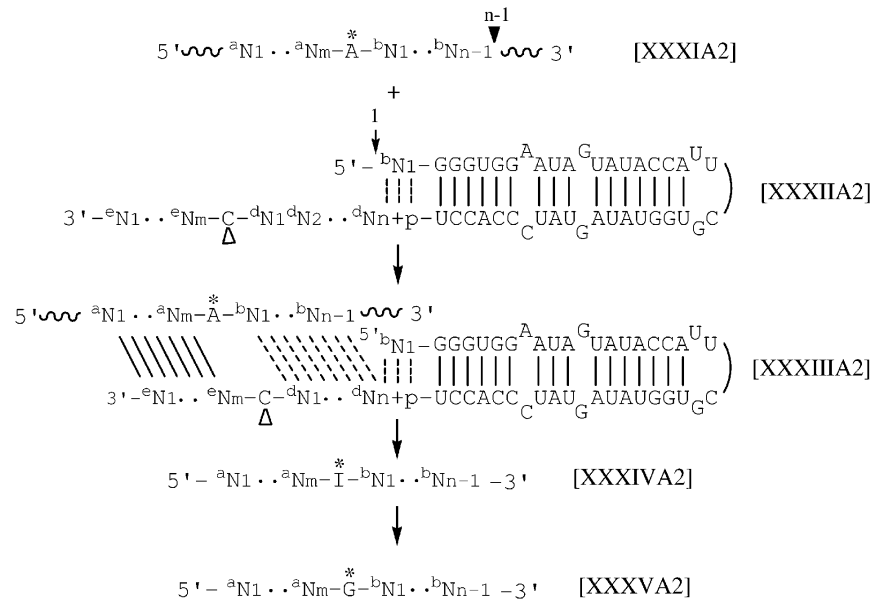


10

【0 1 0 6】

【化 8 1】

20



30

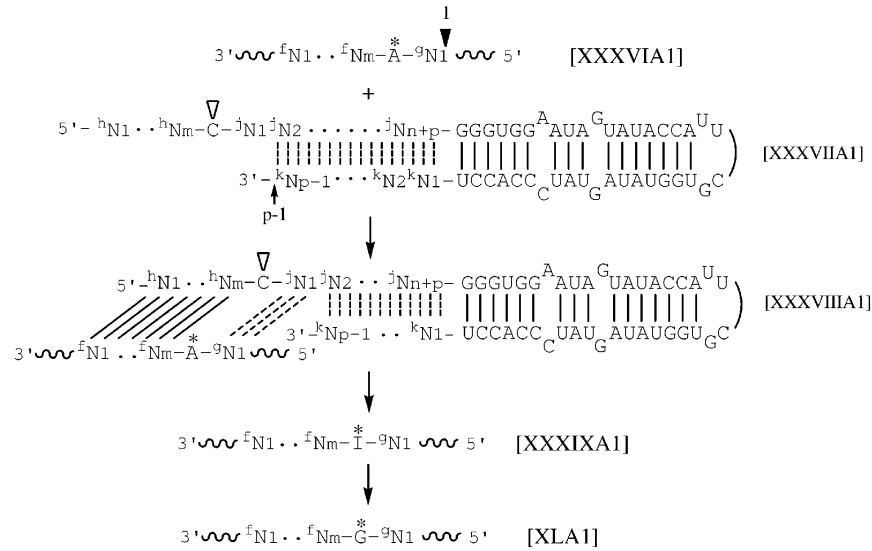
【0 1 0 7】

同様に、標的RNAの各部位（黒三角印で示した）で分断することによって、第2標的編集スキームによる本発明のより好ましい態様を次のようにして得ることができる。他の態様も同様に適用することができる。

40

【0 1 0 8】

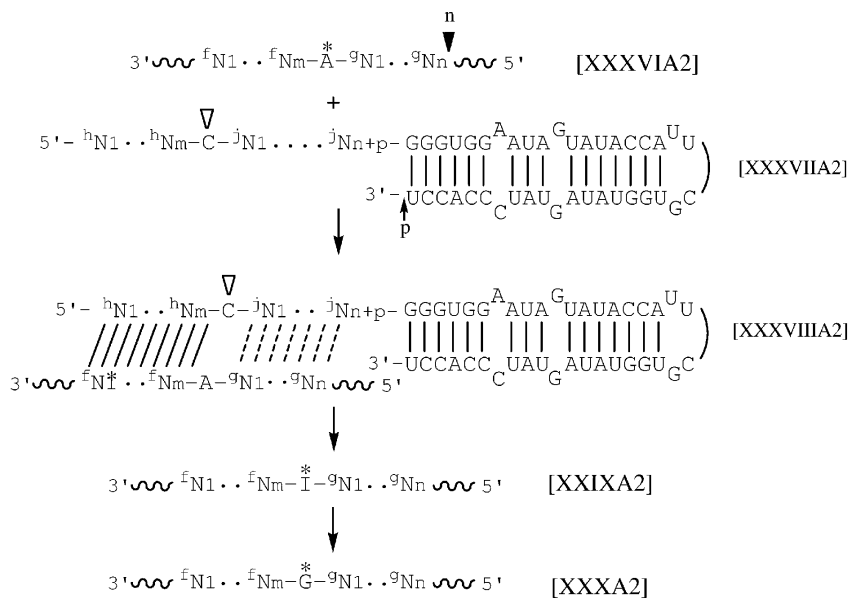
## 【化 8 2】



10

## 【0109】

## 【化 8 3】



20

30

## 【0110】

ここで、本発明における実際のモデルについて説明する。本発明において、モデル標的RNAとして緑色蛍光タンパク質mRNA配列に対して、標的編集ガイドRNAを設計し、標的編集部位にA-I変異を誘導できるかどうかを確認した。そこで設計した各RNAをin vitro転写反応を用いて合成した後、精製した組換えADAR 2を用いてin vitro編集反応を行った。その結果、編集部位は標的編集ガイドRNA依存的に編集されること明らかになった。

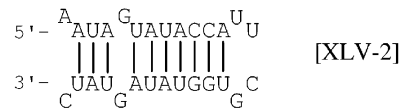
40

## 【0111】

そこで、上記編集基質 [XLVII B] を、その分断部位をさらに1つずつずらして分断すると下記配列の二本鎖からなるADAR結合コア領域を構築することができる。

## 【0112】

【化 8 4】



【0 1 1 3】

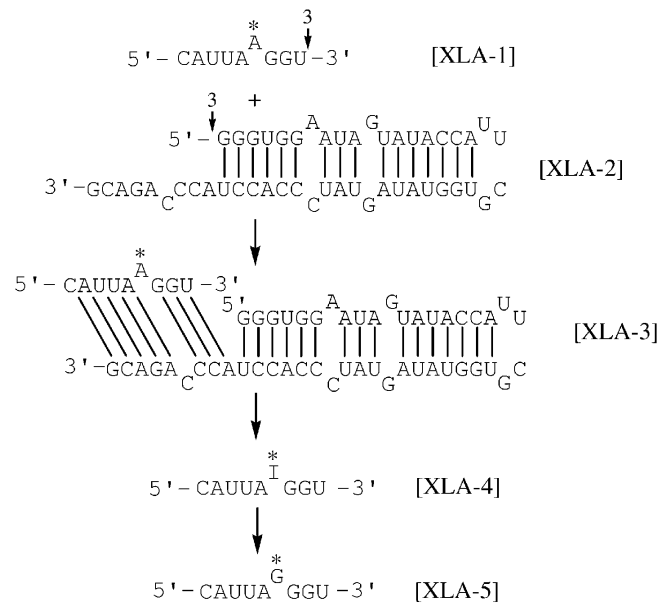
したがって、本発明の標的編集ガイドは、ADAR結合コア領域の両端に標的認識領域とガイド側切断領域の塩基配列をそれぞれ結合することによって構築することができる。

【0 1 1 4】

たとえば、標的編集部位（＊印）を含む編集基質（例えばMiniSL RNA [XLA] など）を、該標的編集部位を含む領域と、ADAR結合領域に分断部位（例えば矢印0番から9番のそれぞれの部位）で分断することによって、標的RNAと、標的編集ガイドRNAにそれぞれ分離することができる。例えば、矢印3番の部位で分断した場合、本発明の標的編集スキームは次のように表すことができる。

【0 1 1 5】

【化 8 5】



【0 1 1 6】

また、3'ー標的RNAを使用した場合でも、上記5'ー標的RNAの場合と同様に標的塩基アデノシンがイノシンに変換される。ここでは、上記編集基質（miniSL RNA）[XLA] の標的編集部位を入れ替えて設計した編集基質（miniSLr RNA）[XLIA] を例に挙げて説明する。

【0 1 1 7】

10

20

30

40

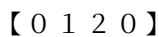
5'-CGUUU<sup>\*</sup>GGUGGGUGG<sup>A</sup>AUA<sup>G</sup>UAUACCA<sup>U</sup>U  
 3'-GCAGA<sub>C</sub>CCAUCCACC<sub>C</sub>UAU<sub>G</sub>AUAUGGU<sub>G</sub>C [XLA]

↓

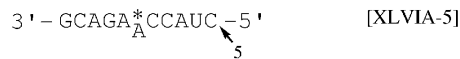
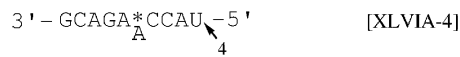
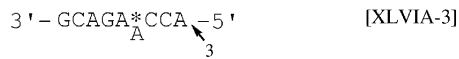
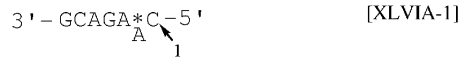
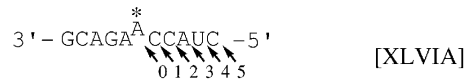
5'-CGUUU<sup>C</sup>GGUGGGUGG<sup>A</sup>AUA<sup>G</sup>UAUACCA<sup>U</sup>U  
 3'-GCAGA<sub>A</sub>\*CCAUCCACC<sub>C</sub>UAU<sub>G</sub>AUAUGGU<sub>G</sub>C [XLI]

分断部位

20



## 【化 8 8】



10

20

## 【0 1 2 1】

これらの標的RNAは、上記標的編集ガイドRNA [XLVA-0] ~ [XLVA-5] とそれぞれ相補して複合体を生成し、ADARの作用によりA-I編集能が誘導されて標的塩基アデノシンがイノシンにそれぞれ変換される。

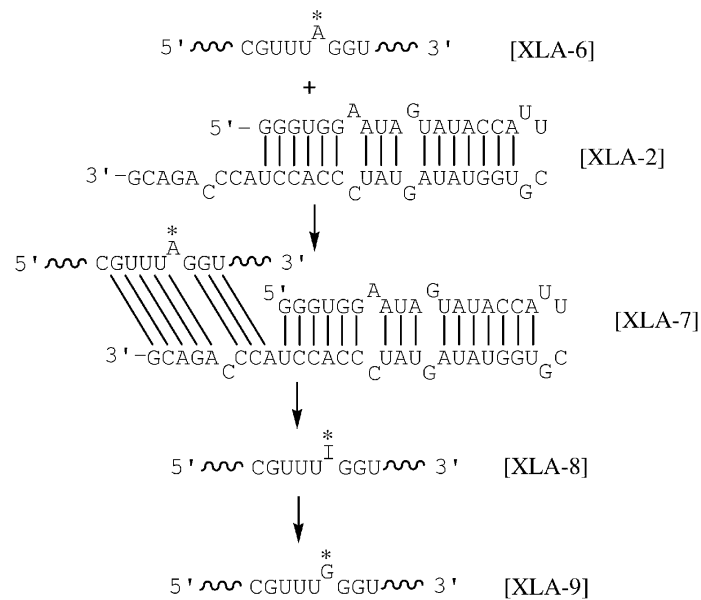
## 【0 1 2 2】

これらの標的編集ガイドRNAは、当然のことながら、対応するそれぞれの標的RNAを含む全長RNAまたは部分長RNAと相補して複合体化し、ADARが作用することによって標的塩基アデノシンがイノシンに変換される。例えば、矢印3番で分断した標的編集ガイドRNA [XLA-2] を使用した場合、対応する標的RNA [XLA-1] を含む全長RNAまたは部分長RNA [XLA-6] と相補して複合体化して5'-標的RNA-3'-標的編集ガイドRNA複合体 [XLA-7] が生成し、次いでADARの作用によってA-I編集能が誘導されて5'-編集標的RNA [XLA-8] に変換され標的塩基アデノシンがイノシンに変換される。この編集標的RNAのイノシンはグアノシンに翻訳され5'-翻訳標的RNA [XLA-9] に変換される。その他についても同様である。

30

## 【0 1 2 3】

【化 8 9】



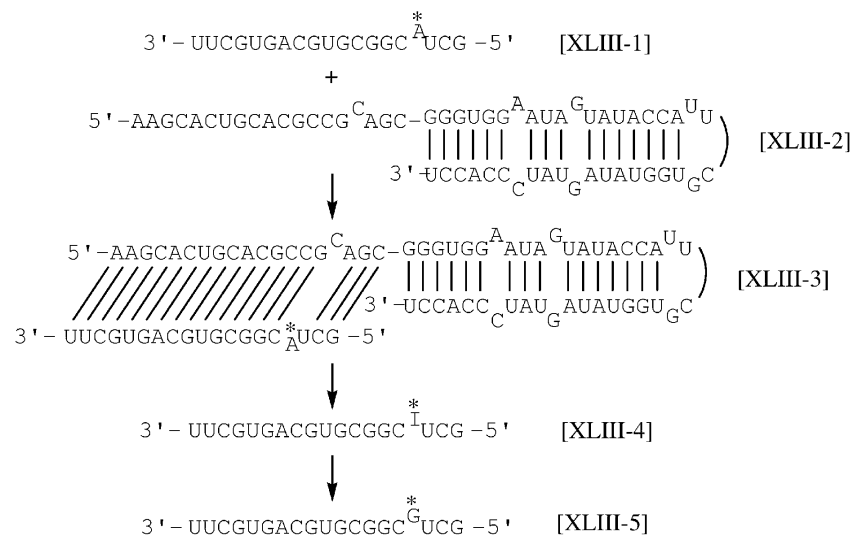
10

【0 1 2 4】

20

本発明は、その他の標的編集ガイドを用いても同様に実施することが可能である。例えば、GFPRNAを使用した場合について説明する。

【化 9 0】



30

【0 1 2 5】

40

上記標的RNA [XLIII-1] を全長RNAまたは部分長RNAとして使用した場合も同様である。

【0 1 2 6】

## 10



## 30

40

本発明に係るA-I RNA編集反応に使用される編集ガイドRNA (gRNA) としては、例えば、一般式 [LIA] で表される3'-編集ガイドRNAまたは一般式 [LVIA] で表される5'-編集ガイドRNAである。

ドRNAが挙げられる。より具体的には、3'-編集ガイドRNA [LIA] は、3'-標的認識領域とADAR結合領域とから構成されている。同様に、5'-編集ガイドRNA [LVIA] は、5'-標的認識領域とADAR結合領域とから構成されている。

#### 【0133】

更に詳細には、3'-編集ガイドRNA [LIA] の3'-標的認識領域は、3'-[末端側標的認識領域－X－コア側標的認識領域] から構成され、コア側標的認識領域の5'末端がADAR結合コア領域の3'-末端と結合した構造になっている。一方、5'-編集ガイドRNA [LVIA] の5'-標的認識領域は、5'-[末端側標的認識領域－X－コア側標的認識領域] から構成され、コア側標的認識領域の3'末端がADAR結合コア領域の5'-末端と結合した構造になっている。なお、標的認識領域はアンチセンス領域ともいう。

10

#### 【0134】

ここで注目すべきことは、編集効率を改善するために、いずれのコア側標的認識領域は、その塩基数が、対応するADAR結合領域のガイド側分断領域の塩基数よりも多く、つまり塩基配列が長くなるように設計するのが好ましい。つまり、コア側標的認識領域の塩基配列の塩基数は、1～10個、好ましくは1～5個であるのがよい。

#### 【0135】

図22Bを参照して具体的に説明すると、例えば、編集対象A200を有する3'-gRNA (ADg-GFP\_A200) (68 nt) は、アンチセンス領域の塩基数は19 nt、ADAR結合領域の塩基数が49 ntであり、コア側標的認識領域の塩基数が3個ほど長く設計した。また図22Aの場合も同様である。この他の例においても同様である。

20

#### 【0136】

つまり、本発明の主な1つの目的は、本来のhADAR2のA-I RNA編集活性を誘発する単純なgRNA設計を提供し、そのgRNAを部位特異的RNA変異誘導に応用することである。gRNAは、一般に、標的RNAにフィブリラリン (Fibrillarin) やCbf5などの酵素タンパク質を誘導するタンパク質結合領域と、塩基対合を介して標的RNAを仲介するアンチセンス領域とからなる。加えて、gRNAの最も重要な特長は、gRNAに結合したタンパク質が、アンチセンスgRNA領域が標的RNAにハイブリダイズした後、標的部位と効果的に反応するように位置していることである。かかる機能を有するhADAR2をガイドするRNA (AD-gRNA) を構築するために天然の編集基質の二次構造に着目した。

#### 【0137】

30

本発明に係るgRNAとhADAR2の編集反応において、dsRBDは、基質RNA結合を主に制御し、デアミナーゼドメインはアデノシンの加水分解性脱アミノ反応を触媒する (図21a)。したがって、基質の自然構造は、dsRBD結合ならびに酵素活性に要求される二重鎖構造に適応していると考えられる。そこで、天然の編集基質RNAをもとに、dsRBD結合領域 (編集部位の周辺の塩基対合を形成するアンチセンス配列を含む) を利用すれば、標的RNAとのハイブリダイゼーションの際に本来の基質構造を再構成することができるAD-gRNAが構築できると考えた (図21a)。図21aは発明の部位特異的RNA編集のためのgRNA戦略の概要を示していて、hADAR2によるA-I RNA編集の概要はグレイ色の背景部分に示している。hADAR2は2個のdsRBDとデアミナーゼドメインから構成されている。dsRBDは主に基質RNA結合を制御し、デアミナーゼドメインは加水分解性脱アミノ化を推進する。本発明によれば、特異的A-I RNA編集はADARタンパク質を使用するだけで行うことができる。アンチセンス領域とADAR結合領域とからなるAD-gRNAは、天然の基質RNA構造に基づいて設計した。図中、標的編集部位は○A印を付している。AD-gRNAが標的RNAとハイブリダイゼーションすることにより、天然基質RNAの構造が誘起される。再構成された基質RNAに対して、hADAR2が部位特異的に編集反応を行うことで、標的部位特異的RNA編集が達成される。図21bには、天然のhADAR2の編集基質である、GluR2 (GRIA2) pre-mRNAの二次構造を基にして設計したAD-gRNAの配列を示している (非特許文献26)。GluR2 RNA (R/G部位) の既知編集部位は○A印を付している。GluR2 RNAのステムループ構造は、2個の成分に分離でき、1方の成分は標的編集部位を含む標的ガイドRNAとして考えられ、他方の成分はADAR結合領域ならびにアンチセンス領域を含むプロトタイプのAD-gRNAと考えられる (図21

40

50

b)。このGluR2 RNAを2つに分割できる部位を矢じり印で、またAD-gRNAは背景がグレイ色の部分に示している。なお、記号Xは、いずれのヌクレオチドであってもよく、点線は塩基対合を示している。Xが完全に塩基対合すると、同族の編集基質構造が再構成される。この設計図において、アンチセンス領域は標的となるための決定要素として作用し、標的部位によって自由に変えることができる。

#### 【0138】

このAD-gRNA設計図の妥当性を検証するために、*Anthurium coerulescens*から抽出した緑色蛍光タンパク質(AcGFP) mRNA (720 nt; 図21c) に対するAD-gRNA誘導RNA編集を示した。上述した設計によれば、GFP mRNA (ADg-GFP\_A200) のA200を標的とするAD-gRNAは、17-ntアンチセンス領域と49-nt ADAR結合領域(図21b; 詳細な設計図は図22B参照)によって達成される。gRNAとGFP mRNAの結合体形成は、A200部位を含むin vitroで合成したADg-RNA\_A200とAcGFP RNA (160 nt) の短鎖RNAフラグメントを用いたゲルモビリティシフトアッセイとアニーリング反応にて確認した(図23参照)。複合体形成反応後、アニールしたgRNA-mRNAをhADAR2と1時間反応させた。次いで、AD-gRNAの編集誘導効率を、逆転写(RT)ならびにPCRによって生成したAcGFP cDNAを用いた蛍光ダイターミネーターシーケンシング法(非特許文献29)にて分析した(図21c)。図21cはRT-PCRとin vitro編集反応によって得られたGFP cDNAのシーケンスクロマトグラフ図によるAD-gRNAの編集誘導活性を示している。上部パネルはgRNAなしの組換えhADAR2、中央パネルはアンチセンス領域(17 nt)だけ、下部パネルはADg-GFP\_A200での結果を示している。なお、標的部位は矢じり印で示す。図示するように、AD-gRNA非存在下の編集反応では、得られたシーケンシングクロマトグラムには、A200の編集は検出されなかった。また、ADg-GFP\_A200のアンチセンス領域のみを加え編集反応を行った場合、A200はわずかに編集された。一方、これらとは対照的に、ADg-GFP\_A200を加えて編集反応を行った場合は、A200は効率的に編集された(〜80%; G/Aのピーク高の割合から算出)(図21c)。これらの結果は、AD-gRNAがhADAR2編集活性を標的部位特異的かつ高効率に誘導できることを明白に示している。

#### 【0139】

さらに、発明者らは、既に報告されているhADAR2の基質になるヘアピン構造を有するRNA (40 nt) を用いて、AD-gRNA構築における他の基盤構造の有用性を試験した(非特許文献30、31)(図24a)。結果、GluR2由来のADAR結合領域より短い配列を使用したとしても、本設計に従って構築したADガイドRNAは、標的mRNAを効率的に編集した(84.9%)(図24b、c)。これらの結果は、AD-gRNA構築において、多様なRNA配列をADAR結合領域として適用できることと同時に、AD-gRNAの更なる短鎖化が可能であることを強く示している。

#### 【0140】

AD-gRNAの機能的デザインの多様性を拡張した。GluR2 RNAやヘアピン基質などのcis型基質の場合、hADAR2は本来の編集部位とは反対側の鎖上に存在する部位を編集することはできなかった(図25)。他方、gRNAと標的RNAからなるtrans型基質では、標的RNA中のホスホジエステル結合の喪失により、ADAR結合領域は回転自由度を獲得すると予測される。したがって、ADAR結合領域の5'側にアンチセンス領域を有するAD-gRNAも構築できると考えた。この可能性を試験するために、同一部位(A200)を標的とする修飾AD-gRNAを、アンチセンス配列をADAR結合領域の5'位に導入することによって設計した(ADg-rGFP\_A200)(図22Aa)。期待したように、ADg-rGFP\_A200はA200に対して特異的な編集誘導活性を示した(図22Ab)。驚いたことに、この編集活性は、元来のADg-GFP\_A200よりも格段に高かった。図22AbはA200での編集割合の経時的变化を示す。赤色○印は5'-アンチセンス領域、赤色●印は5'-アンチセンスAD-gRNA (ADg-rGFP\_A200)、青色△印は3'-アンチセンス領域、青色▲印は3'-アンチセンスAD-gRNA (ADg-GFP\_A200)、黒色△印はgRNAなしの場合である。各編集割合は、ダイレクトシーケンシングクロマトグラフから生成塩基AとGを定量し、式： $(G \text{ピーク高}) / (A \text{ピーク高} + G \text{ピーク高})$ によって算出した。結果は3回の独立した実験の標準偏差値の平均値で表している。また、この特徴はヘア

ピン基質から生成したガイドRNAにおいても観察された（図24c）。ADAR結合領域の回転自由度の効果をさらに評価するために、標的RNAとの塩基対合を促進するために、その3'側に配列を追加した拡張AD-gRNA（ADg-rGFPex\_A200）について試験した（図26）。ADg-rGFPex\_A200は、ADg-rGFP\_A200に比べて異なる編集特異性と効率を示した（図26）。この結果は、ADAR結合領域の回転自由度が標的編集を誘導するために重要であることを示している。

#### 【0141】

原則として、AD-gRNA誘導RNA編集の特異性は、hADAR2のデアミナーゼドメインの固有の選択性に大いに依存する。したがって、AD-gRNA誘導RNA編集の編集パターンは自然編集した基質のそれと類似していると考えられる。実際、AD-gRNA誘導RNA編集の隣接特異性は、cis型基質にて観察されたものとほとんど同一であった（図25、27）。このことは、AD-gRNAが天然の基質において発生するものと類似する構造を誘導できることを示している。

#### 【0142】

その結果、本発明者らは、アンチセンス領域をADAR結合領域の5'側に導入することによって高活性なAD-gRNAフレームワークの開発に成功した。

#### 【0143】

AD-gRNA誘導A-I RNA編集を用いた機能性タンパク質発現のin vitro調節について説明する。部位特異的RNA変異誘発の将来有望な応用としては、特異的なコドンを導入することで標的タンパク質の発現または機能を調節することにあると思われる。かかる応用の可能性を示すために、AD-gRNAをin vitro編集ならびにin vitro翻訳系を用いてコドン修復実験を行った。この実験では、レニラルシフェラーゼ（Renilla luciferase (Rluc)）mRNAのヌクレオチド311をアデノシン（A311）に変換してTrp104コドン（UGG）をストップコドン（UAG）に変換することによって得られた、Rluc-W104Xをレポーターとして使用した（図28）。イノシンは翻訳機構によってグアノシンとして読み取られるので、活性な成熟ルシフェラーゼは、A311がADg-rRluc\_A311によってI311に編集された後、Trpコドン（UGG；図28a）を再生成したときだけRluc-W104Xから翻訳される。つまり、AD-gRNA誘導A-I RNA編集によるタンパク質発現の調節は、編集レポーターRNAのin vitro翻訳後のルシフェラーゼ活性をモニターすることによって分析することができる。

#### 【0144】

まず、5'-アンチセンスフレームワークに基づいてコドン変換を有するAD-gRNAを設計した（ADg-rRluc\_A311；図29）。ADg-rRluc\_A311によって誘導されたコドン変換を評価するために、in vitro編集反応後にA311における編集効率を分析した。ADg-rGFPについて観察された結果と同様に、得られたシーケンシングクロマトグラム図において、A311を効率的かつ部位特異的に編集することができた（図28b）。つまり、上記反応により、A311がI311に変換されたRluc-W104X mRNAを得ることができた。次に、AD-gRNAによって生じられるコドン変換が活性なルシフェラーゼ発現を制御できるかどうかを実証するために、編集反応後のRluc-W104Xを使用してin vitro翻訳反応した後、ルシフェラーゼアッセイを行った（図28c）。サンプルのルミネッセンス発光スペクトル分析は、野生型luciferase mRNA（Rluc-WT黒色）、Rluc-W104X（青色）またはin vitroで編集したRluc-W104X（紫色）とin vitro翻訳反応後に行った。その結果、未編集Rluc-W104Xトランスクリプトを使用した場合、活性なルシフェラーゼ発現は観察できなかった。対照的に、編集反応後のRluc-W104Xトランスクリプトを使用して翻訳したサンプルからは、典型的なルミネッセンス発光スペクトラムを検出した。加えて、そのルミネッセンス強度は、ワイルドタイプRluc mRNA（Rluc-WT）を用いて得られたものと同等の値が得られた。これらの結果は、AD-gRNA戦略が機能性タンパク質発現を調節するのに効果的に応用できることを明らかに示している。

#### 【0145】

さらに、より複雑な環境におけるAD-gRNAの可能性を調べるために、同時編集反応を行った（図30a）。この実験では、ADg-rRluc\_A311、Rluc-W104XおよびhADAR2をin vitro

翻訳に必要な反応成分と一緒に混合した後、30分間反応後、編集効率とルシフェラーゼ活性を分析した。反応終了後、Rluc-W104X のA311における編集効率は47%であった(図30b)。また、同時反応においてもルシフェラーゼ活性は観察され、このルミネッセンス強度は上記単独反応で検出された値のほぼ半分であった(図28c)。

#### 【0146】

続いて、AD-gRNA戦略に基づいて、細胞内RNA変異導入を行った。AD-gRNAの最も重要な利点は、天然のhADAR2の編集活性を誘導する能力である。したがって、細胞内標的RNA変異誘導は、外来タンパク質を必要とせず、AD-gRNAのhADAR2発現細胞中への導入のみで達成できる。このことを実証するために、hADAR2とAcGFPをドキシサイクリン(Dox)誘導性プロモーターの制御下で同時発現できるtet-ADAR2細胞株(非特許文献32)をhADAR2発現モデル細胞として使用した(図31a)。この実験では、以前の試験ですでに特徴付けたADg-GFP\_A200とADg-rGFP\_A200が、tet-ADAR2細胞中でhADAR2の編集活性をAcGFP mRNAにガイドできるかどうかを調べた。今回の実験では、AD-gRNAを細胞内に導入する方法として、プラスミドベクターによって発現させる方法を用いた。また、AD-gRNA戦略の有用性が、これまでのsiRNAやmiRNA技術に匹敵できるかどうかを示すために、発現ベクターには、一般に使用されているpol IIIで短鎖RNAを発現するpSuper neoを用いた。(図31a)。各種AD-gRNAの発現プラスミドは上記短鎖RNA発現ベクターを用いて構築した。hADAR2とAD-gRNAの発現は、ウススタンプロットティングとリアルタイムPCRでそれぞれ確認した(図32と図33)。AD-gRNA誘導性A-I RNA編集の効率を分析するために、GFP mRNAを、プラスミドを形質導入し、Doxと共培養したtet-ADAR2細胞から抽出し、RT-PCR後ダイレクトシーケンシングを行った。その結果、AD-gRNA発現プラスミドの形質導入による、標的部位A200の編集が検出された(図31)。図31bには、tet-ADAR2細胞内でのADg-GFP\_A200とADg-rGFP\_A200の特異的編集誘導活性を確認した結果を示している。上部パネルはプラスミドトランスフェクションなし(guide [-])、中央パネルはADg-GFP\_A200また下部パネルはADg-rGFP\_A200の発現プラスミドを導入し培養した細胞から得られたGFP cDNAのシーケンスクロマトグラフ図を示す。図中、標的塩基アデノシン(A200)は矢じり印で示している。ADg-GFP\_A200とADg-rGFP\_A200を発現する細胞からのヌクレオチドA200での編集効率はそれぞれ34.9%と30.5%であった(図31と図34)。加えて、抽出されたAcGFP mRNAのアデノシンではいずれも明らかなオフターゲット編集(標的部位ではない非特異的な編集)は検出されなかった。したがって、これらの結果は、AD-gRNAはhADAR2発現細胞内では良好に作用していることを示している。これらの結果によって最も重要な点は、細胞内部位特異的RNA変異誘導がAD-gRNAの単純なプラスミド形質導入で行えることである。

#### 【0147】

加えて、AD-gRNA戦略による細胞内タンパク質の機能発現制御が可能であることを実証するため、細胞内コドン修復実験を行った。AD-gRNA誘導コドン修復によって誘起される細胞内タンパク質の機能発現制御を可視化するために、コドンTrp58内のG173を変異させてストップコドンを導入した変異 A173GFP mRNA (GFP-W58X RNA) をレポーター遺伝子として使用した(非特許文献25、33)。また、ADg-rGFP\_A173は、このストップコドンをTrpコドンに修復するように設計し、対応する発現プラスミドをpSUPER neoベクターを使用して構築した。hADAR2とGFP-W58Xの発現には、タンパク質発現に慣用されているpcDNA 3.1ベクターに基づいて発現プラスミドを構築し、これらのプラスミドを共HEK293細胞に形質導入した後、48時間培養後に細胞内蛍光を蛍光顕微鏡で検出した。GFP-W58Xならば／もしくはhADAR2プラスミドで形質導入した AD-gRNA発現欠如コントロール細胞を用いた場合は明白な蛍光を有する陽性の細胞は検出されなかった(図31c)。対照的に、明るい蛍光を有するいくつかの細胞が、AD-gRNA発現プラスミドを形質導入することによって同定された(図31c)。以上の結果より、ADg-rGFP\_A173によるRNA変異導入により、成熟GFPの生合成を調節できることを示した。得られた結果は、AD-gRNA戦略に基づく標的タンパク質の機能を調節するためのRNA変異誘導の有用性をはっきりと示している。

#### 【0148】

前述したような細胞内A-I RNA編集の多様な方法は、実用的な部位特異的RNA変異誘導を

確立するための重要な突破口になりえる。以前は、人工gRNAが天然リボタンパク質のRNA修飾活性を指向するために使用されていた（非特許文献19-21）。しかしながら生体内におけるA-I RNA編集は、ADARタンパク質のみで行われており、ADARを誘導するgRNAは自然界では発見されていない。したがって、これまでの方法に従ったgRNA戦略をA-I RNA編集誘導に直接応用することは不可能であった。部位特異的RNA編集は、以前、人工gRNAと修飾したADARタンパク質からなる有用なエディターゼ（editases）を使用して達成できたが（非特許文献22、23、24）、これらの方法は内在性修飾機構を利用しgRNA導入のみで目的を達成するという、これまでのgRNA戦略の利点が失われている。そこで、内在性ADARの編集活性を目的部位に自在に誘導できる新規なgRNAを構築することで、内在性A-I RNA編集機構を利用した部位特異的RNA変異導入法が構築できると考えた。

10

#### 【0149】

本発明は、AD-gRNAは、hADAR2発現部位を有する天然もしくは人工編集基質の二次構造に基づいて簡単に設計できる。GluR2 RNAの場合、hADAR2のdsRBDが結合する領域はNMRによる構造解析により明らかにされている（非特許文献34）。構造情報から判断すると、GluR2 RNAは2つの部分に分割されていて、1つの分割部分は編集部位を有する標的RNAと考えられ、またもう1つの分割部分はADAR結合領域とアンチセンス領域からなるプロトタイプ型AD-gRNAと考えられる（図21b）。理論的には、分割したRNA同士は、再結合することにより、編集基質構造が再構築される。したがって、AD-gRNAは、アンチセンス領域を変更して標的配列に適合させることによって標的塩基アデノシンのいずれに対してもhADAR2によってA-I編集を誘導することができる。実際、GFPとLuc mRNA上の種々の部位を標的とするAD-gRNAはこの設計で構築することができた。加えて、本発明の結果から、AD-gRNAによって誘導されるRNA編集の隣接特異性は、天然基質において観察された結果と非常に類似していた（図25、26）。このことは、AD-gRNAとRNAからなる複合体は、天然の編集基質構造に類似した構造を形成していることを示している。

20

#### 【0150】

本発明のAD-gRNAは、両RNA成分間の分割ラインを標的編集部位のヌクレオチド3個（nt）下流の位置に固定した基本骨格を使用して構築した（図21b）。この分割ラインが0 ntまたは1 ntであるときには編集効率は減少したが、距離が2-5 nt離れているときにはほぼ一定の編集効率が観察された（図35）。これらの観察結果から、このAD-gRNAデザインでは、hADAR2との反応を効率的に駆動するためには、標的編集部位とADAR結合領域との間で2個またはそれ以上の塩基対合を含む二本鎖構造が必要であるといえる。したがって、本実験では3 bpフレームワークを使用した。別の方法としては、分割ラインを変えることによって、編集効率をある程度変化させることはできることから、AD-gRNA構築において異なる基本骨格が使用できる可能性が示された。

30

#### 【0151】

通常では、アンチセンス領域は、GluR2 RNAに基づいて、このデザインの3'側に位置しているが、AD-gRNAのデザインでは、ADAR結合領域の3'側にも、5'側にも位置することができる。アンチセンス領域の位置がこのように交換可能であると考えられるのは、標的RNA中のホスホジエステル結合の喪失によって生起されるADAR結合領域の回転自由度が増加する結果によると考えられる。この考え方は、配列を3'側に追加導入したときに、標的RNAとの塩基対合が生起され、またADAR結合領域の回転自由度が抑制されることが観察されるようなADg-rGFPexの異なる編集挙動によって支持されている（図27）。実際、5'-アンチセンスAD-gRNAの編集効率は、3'-アンチセンスAD-gRNAよりも高効率であった。AD-gRNAと標的RNAからなるトランス型基質の場合では、3'-アンチセンスAD-gRNAがhADARの編集誘導にとってより有利な構造を誘導できるかもしれない。

40

#### 【0152】

hADAR2はdsRNA内のアデノシンを優先的に編集するので、単純なアンチセンスRNAもまたガイドRNAとして使用できる強い可能性がある。ADg-GFP\_A200のアンチセンス領域は、A-I編集を誘導する能力を示しているが（図21c）、ADAR結合領域が導入された完全なAD-gRNAにて観察されるよりもその効率は著しく低かった。この結果は、ADg-RNAが効率的な編

50

集を誘導するための高い多能性を有していることを示している。

#### 【0153】

しかしながら、非特異的編集は標的の周辺配列に左右されてアンチセンス領域において発生し得る。具体的には、dsRNA構造中では、標的塩基アデノシンから11塩基離れたntが立体的に同じ表面に位置する。したがって、この位置に存在するアデノシンは、誘導されたADARによって非特異的に編集される可能性がある。加えて、AD-gRNAによって誘導される編集パターンはhADAR2固有の特性に高度に依存している。例えば、もし標的部位が連続するアデノシン配列内に存在する場合、その標的部位に隣接するアデノシンは同時に編集される(図25、26)。したがって、本発明のAD-gRNAデザインを使用して、天然のままのhADAR2の固有の性質よりも隣接部位での編集特異性を高く改良するのは難しいと  
10  
考えられる。ADARによる望ましくない編集は、ミスマッチしたntを、目的のアデノシンに対する相補位置に導入すること、またはアンチセンス領域の隣接ヌクレオチドを修飾することによって、効果的に抑制することができることが報告されている(非特許文献23)。この人工エジターゼで観察された反応特異性の類似性を考慮すると、AD-gRNA誘導RNA編集のためのこれらの戦略を標的選択性を調節するために応用することは可能であると考えられる。反対に、天然のhADAR2の隣接特異性を利用することで、一度に多数のアデノシンを編集することができる。

#### 【0154】

本発明によれば、ADAR結合領域を修飾するのに成功している(図24)この結果は、GluR2 Q/R部位(非特許文献35)やNEIL1 K/R部位(非特許文献36)などの天然の編集基  
20  
質RNAから、本発明とは異なるADAR結合領域を使用してAD-gRNAを構築できる可能性を強力に示している。GluR2R/G部位は、もう1つのRNA編集酵素であるhADAR1によっても編集されることが知られている。hADAR1はhADAR2と同様のドメイン構造を有することから(非特許文献13、37)、本発明のデザイン戦略はhADAR2ガイドRNAばかりではなく、hADAR1ガイドRNAにも同様に適用できる。従って、本発明で開発したAD-gRNAは、そのままhADAR1の編集活性も誘導できると考えた。そこで、hADAR1を用いた編集誘導アッセイを行った。結果、hADAR2の場合と比較して効率は低下したものの、確かに編集誘導が可能であることを明らかにした。本ガイドRNA設計は、hADAR1及びhADAR2ともに有効であることを示した。

#### 【0155】

標的選択性と効率は一般的に応用可能な変異誘導方法であるための2つの最も重要な要件であると考えられる。本発明によるAD-gRNAは、in vitroでも、細胞内でも効果的で、部位選択的活性を示したが、さらに最適化することによって、その意図する用途に従ってAD-gRNAの活性を改善することができるものと期待できる。本発明のデザインによる機能的調整の多様性は、編集効率の改善と、非特異的編集の回避に非常に有用である。  
30

#### 【0156】

細胞内部位特異的RNA編集は、単にhADAR2発現細胞内においてAD-gRNAを発現することによって達成することができる。その上、この発明によるコドン修復実験(in vitroならびに細胞内)において、本発明のAD-gRNA戦略がコドンを変換して、最終的には標的タンパク質の機能を変化させることに応用できることが明白に示された。mRNAのコーディング  
40  
領域内に生成したA-I変異によって、理論上、全20アミノ酸のうち12アミノ酸(Ser、Thr、His、Lys、Arg、Asp、Glu、Asn、Gln、Tyr、IleならびにMet/start)を変化させることができる。これらのコドン変換には、金属キレート化部位(一般的には、His、AspならびにGlu)やリン酸化部位(Ser、ThrならびにTyr)が含まれているので、A-I RNA編集は、酵素触媒やタンパク質リン酸化シグナル伝達など、様々な細胞内の重要なタンパク質の機能を強力に制御できる可能性が高い。したがって、本発明のAD-gRNA戦略は、様々な生物学的プロセスの制御に応用可能な新たな部位特異的RNA変異誘導方法として大きな可能性を有している。

#### 【0157】

要約すると、本発明の新規なgRNAシステムは、hADAR2を標的部位にガイドすることによ  
50

ってA-I変異を誘導することができる。AD-gRNAはアンチセンス領域にプログラムされた標的部位にA-I変異を特異的に導入することができる。その上、本発明の部位特異的RNA変異導入法はgRNAをADAR発現細胞中に導入するだけで達成することができる。このように本発明のgRNA戦略は、単純なデザインで、使い勝手がよく、一般的なRNA変異誘導を確立するために必要な基本的なフレームワークを提供する。

#### 【0158】

以下、本発明について実施例にてより具体的に説明するが、下記実施例は本発明をより具体的に説明する意図であって、あらゆる意味で本発明を一切限定するものではない。当然のことながら、下記実施例から由来または派生するあらゆる改善、変形などは本発明の範疇に包含されるものである。

#### 【実施例1】

#### 【0159】

(3'-標的編集ガイドRNAの合成)

合成オリゴDNA (1) (guide RNA\_D3\_tempT7F) 100 mMと合成オリゴDNA (2) (guide RNA\_D3\_tempR) 100 mMを含む反応溶液を95℃で3分間、続いて25度に減温して15分間処理してアニーリング反応を行ってDNA (guide RNA\_D3\_tempF/R) を得た。続いて、2.5 mM dNTPと5000 U/mL Klenow fragmentを加え(終濃度: guide RNA\_D3\_tempF/R 2 mM、dNTP 0.2 mM、Klenow fragment 2.5 U) を25℃で30分間伸長し、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によりDNAを精製した。得られたDNAを鋳型とし、T7-Scribe Standard RNA IVT KITを用いてin vitro転写(37℃3時間)によりRNA (3'-標的編集ガイドRNA 1) を合成した。その後、DNase (終濃度: 2 U) を加え、37℃で15分間処理し、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によってRNAを精製した。得られたRNAを8 M Urea PAGE (8 %) で精製して、粉碎・浸漬によって抽出し、0.22 mm フィルター(DURAPORE)およびゲル濾過(BIO RAD)によって精製した。

#### 【0160】

つまり、3'-標的編集ガイドRNAをインビトロで合成するために用いる鋳型DNAは、合成オリゴDNA (1) guide RNA\_D3\_tempT7Fと合成オリゴDNA (2) guide RNA\_D3\_tempRを用いて合成した。用いた各合成オリゴDNAの塩基配列は次の通りである。

#### 【0161】

(1) guide RNA\_D3\_tempT7F (48 mer)

CTAATACGACTCACTATAGGGTGGGAATAGTATACCATTCGTGGTATAG

(2) guide RNA\_D3\_tempR (44 mer)

TGACCACCCTGAGCTGCGGAGGTGGGATACTATACCACGAATGG

#### 【実施例2】

#### 【0162】

(3'-標的編集ガイドRNAの合成)

合成オリゴDNA (3) (guide RNA\_D0\_tempT7F) 100 mMと合成オリゴDNA (4) (guide RNA\_D0\_tempR) 100 mMを含む反応溶液を、実施例1と実質的に同様にして処理してRNA (3'-標的編集ガイドRNA 2) を得た。

#### 【0163】

合成オリゴDNA (3) (guide RNA\_D0\_tempT7F) および合成オリゴDNA (4) (guide RNA\_D0\_tempR) の塩基配列は次の通りである。

(3) guide RNA\_D0\_tempT7F (51 mer)

CTAATACGACTCACTATAGGTGGGTGGGAATAGTATACCATTCGTGGTATAG

(4) guide RNA\_D0\_tempR (44 mer)

TGACCACCCTGAGCTGGGTAGGTGGGATACTATACCACGAATGG

#### 【実施例3】

#### 【0164】

(5'-標的編集ガイドRNAの合成)

合成オリゴDNA (5) (guide RNA\_D3r\_tempT7F) 100 mMと合成オリゴDNA (6) (guide

10

20

30

40

50

RNA\_D3r\_tempR) 100 mMを含む反応溶液を、実施例 1 と実質的に同様にして処理してRNA (3'-標的編集ガイドRNA 3) を得た。

【0165】

合成オリゴDNA (5) (guide RNA\_D3r\_tempT7F) および合成オリゴDNA (6) (guide RNA\_D3r\_tempR) の塩基配列は次の通りである。

(5) guide RNA\_D3r\_tempT7F (45 mer)

CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCCGCGCGGGTG

(6) guide RNA\_D3r\_tempR (49 mer)

AGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATACTATTCCACCCGCTGCGGCG

【実施例 4】

10

【0166】

(5'-標的編集ガイドRNAの合成)

合成オリゴDNA (7) (guide RNA\_D0r\_tempT7F) 100 mMと合成オリゴDNA (8) (guide RNA\_D0r\_tempR) 100 mMを含む反応溶液を、実施例 1 と実質的に同様にして処理してRNA (3'-標的編集ガイドRNA 4) を得た。

【0167】

合成オリゴDNA (7) (guide RNA\_D0r\_tempT7F) および合成オリゴDNA (8) (guide RNA\_D0r\_tempR) の塩基配列は次の通りである。

(7) guide RNA\_D0r\_tempT7F (45 mer)

CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCCGCGGTGGGTG

(8) guide RNA\_D0r\_tempR (52 mer) :

GGTAGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATACTATTCCACCCACCGCGGCG

20

【実施例 5】

【0168】

(GFP RNA (標的RNA) の合成)

GFP-Gq-TK Plasmidを鋳型とし、100 mM AcGFP\_sRNA01\_T7F01プライマー、100 mM AcGFP\_sRNA01\_R01プライマー、2.5 mM dNTP、1.25 U/mL Prime Star GXLを含む反応溶液中でPCR (1サイクル (98℃ 10秒間、55℃ 30秒間 68℃ 30秒間)、30サイクル) によって増幅した (終濃度: GFP-Gq-TK Plasmid 4.0 pg/mL, AcGFP\_sRNA01\_T7 F/R 0.3 mM, dNTP 0.2 mM, PrimeStar GXL 2.5 U)。増幅したPCR製品をフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によりDNAを精製した。得られたDNAを鋳型とし、T7-Scribe Standard RNA IVT KITを用いてin vitro転写 (37℃、3時間) によりRNAを合成した。その後、DNase (終濃度: 2 U) を加え、処理し (37℃、15分間)、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によってRNAを精製した。得られたRNAを8 M Urea PAGE (8 %) で精製して、粉碎・浸漬によって抽出し、0.22 mmフィルター (DURAPORE) およびゲル濾過 (BIO RAD) によって精製した。

30

【0169】

AcGFP\_sRNA01\_T7F01プライマーの塩基配列は次の通りである。

CTAATACGACTCACTATAGGGCCACCCTGGTGACCACCC

【0170】

40

AcGFP\_sRNA01\_R01プライマーの塩基配列は次の通りである。

GCGCGCGACTTGTAGTTGCC

【実施例 6】

【0171】

(標的編集ガイドRNAと基質RNA (標的RNA) の複合体形成反応)

アニーリングバッファー (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)) 中で、精製した各標的編集ガイドRNA (終濃度: 0.45 mM) と標的RNA (GFP sRNA 01) (終濃度: 0.45 mM) のアニーリング反応 (80℃ 3分間→25℃ 15分間) を行った。反応後、8 % Native PAGEで標的RNA (GFP RNA) と標的編集ガイドRNAの複合体の形成を確認した。

【0172】

50

GFP sRNA 01の塩基配列は次の通りである。

GFP sRNA 01:

5'-GGGUGAAUGGCCACAAGUUCAGCGUGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUC  
AUCUGCACCACCGGCAAGCUGCCUGUGCCCUGGCCACCCUGGUGACCACCCUGAGCUACGGCGUGCAGUGCUUCUC-3'

【実施例 7】

【0173】

(標的編集ガイドRNAと基質RNA(標的RNA)の複合体形成反応)

アニーリングバッファー(150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6))中で、精製した各標的編集ガイドRNA(終濃度:0.45 mM)と標的RNA(GFP sRNA 01)(終濃度:0.45 mM)のアニーリング反応(80℃3分間→25℃15分間)を行った。反応後、8% Native PAGEで標的RNA(GFP RNA)と標的編集ガイドRNAの複合体の形成を確認した。

【実施例 8】

【0174】

(編集ガイドRNAの編集誘導能の評価)

実施例1で精製した5'-標的編集ガイドRNA1)または実施例3で精製した3'-標的編集ガイドRNA3(各終濃度:0.45 mM)と実施例5で合成した標的RNA(GFP RNA)(終濃度:0.45 mM)をアニーリング反応(80℃3分間→25℃15分間)してRNA複合体をそれぞれ得た。得られたRNA複合体(0.45 mM)をTE Bufferで50 mMになるように希釈した。希釈後、RNA複合体(終濃度:5 nM)に精製した組換えhADAR2(終濃度:0.8 mM)を加え、編集反応を行った(37℃、1時間)。編集反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によりRNA複合体1またはRNA複合体2をそれぞれ精製した。得られた各RNA複合体の沈殿をTE Buffer 5 mLに溶解し、Prime Script Reverse Transcription KitとAcGFP\_sRNA\_R01プライマー(終濃度:2.5 mM)を用いて逆転写反応を行った(65℃5分間急冷、42℃45分間、70℃15分間)。得られたcDNAを鋳型として用い、PCR(1.25 U/mL Prime Star GXL、AcGFP\_sRNA\_T7F01プライマー、cGFP\_sRNA\_R01プライマー、2.5 mM dNTP)(1サイクル(98℃10秒間、55℃15秒間、68秒間20秒間)、25サイクル)により二本鎖DNAを増幅した。その後、増幅したDNAとBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて、DNA塩基配列解析を行った。得られたクロマトチャートの標的編集部位のA(T)とG(C)のピーク比(G/A+G)から編集率を算出した。RNA複合体1およびRNA複合体2のそれぞれの編集率は88.1%および91.2%であった。これに対して、標的RNAだけのコントロールはいずれも2.7%であった。

【実施例 9】

【0175】

3'-標的RNA[XLVIA-0~XLVIA-5]と5'-標的編集ガイドRNA[XLVA-0~XLVA-5]をそれぞれアニーリング反応させて得た複合体について、実施例8と実質同様にして編集率を算出した。その結果を下表1に編集率の経時的变化を示す。

【表1】

| 時間<br>(分) | 3'-標的RNA-3'-標的RNA (XLVA + XLVIA) |      |      |      |      |      |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|------|
|           | 0                                | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    |
| 0.5       | 3.3                              | 3    | 4.3  | 3.3  | 5.3  | 6.7  |
| 5         | 3.3                              | 7.8  | 13.5 | 14.2 | 25.4 | 24.4 |
| 10        | 3.4                              | 9.5  | 22.8 | 20.9 | 30.4 | 37.8 |
| 15        | 3.3                              | 16.3 | 32.1 | 30.8 | 43.7 | 44.3 |
| 30        | 8.9                              | 25.5 | 44.6 | 44.6 | 57.9 | 52.4 |
| 60        | 3.2                              | 33.9 | 59.2 | 61.9 | 67.2 | 65   |
| 120       | 2.3                              | 44.1 | 70.6 | 74.9 | 62.4 | 67.2 |
| 180       | 3                                | 45.6 | 73.9 | 76.8 | 79.6 | 74.8 |

【実施例 10】

【0176】

以下の実施例において使用する材料は下記のとおりである。DNAオリゴヌクレオチドおよび合成RNAはHokkaido System Science Co., Ltd. (Hokkaido, Japan) とSigma genosys (Hokkaido, Japan) から購入した。すべてのDNAオリゴヌクレオチドおよび合成RNAの配列は表2～表6に示す。

【表2】

**DNA oligonucleotides  
for *in vitro* synthesis of ADg-RNA**

| target                     | name                  | sequence (5'→3')                                             |
|----------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------|
| ADg-GFP_A200               | ADg-GFP_A200_T7F      | CTAATACGACTCACTATAGGGTGGAAATAGTATAACAATATGC                  |
|                            | ADg-GFP_A200_RV       | TGACCACCCTGAGCTGCGG                                          |
| ADg-rGFP_A200              | ADg-rGFP_A200_T7F     | CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCCGACGCGGTGGAATAG           |
|                            | ADg-rGFP_A200_RV01    | AGGTGGGATACTATAACAACATTTAGCATATTGTATATATTCCACCC              |
|                            | ADg-rGFP_A200_RV02    | AGGTGGGATACTATAACAACATTTAGC                                  |
| ADg-rRluc_A311             | ADg-rRluc_A311_T7F    | CTAATACGACTCACTATAGGGTTCAGCAGCTCGAACCAAGGGGTGGAATAGTATAC     |
|                            | ADg-rRluc_A311_RV     | AGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATATATTCCACCC                      |
| sADg-GFP_A200              | sADg-GFP_A200_T7F     | CTAATACGACTCACTATAGGGTGGAAATAGTATACCATTCGTGGTATAG            |
|                            | sADg-GFP_A200_RV      | TGACCACCCTGAGCTGCGGAGGTGGGATACTATACCACGAATGG                 |
| sADg-rGFP_A200             | sADg-rGFP_A200_T7F    | CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCCGACGCGGGTG                |
|                            | sADg-rGFP_A200_RV     | AGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATATATTCCACCCGCTGCGGCG             |
| eSL_AAA                    | eSL_AAA_Eco_FW        | GCTAGGAATTCGCGCTCGAGTCCGTTAAAGTGGGTGGAATAGTATACCATTCGTGG     |
|                            | eSL_AAA_Sph_RV        | GATAAGCATGCGCCAAGCTTCGTCTAGAGTAGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATAC |
| eSLr_AAA                   | eSLr_AAA_Eco_FW       | GCTAGGAATTCGCGCTCGAGTCCGTTCTGTGGGTGGAATAGTATACCATTCGTGG      |
|                            | eSLr_AAA_Sph_RV       | GATAAGCATGCGCCAAGCTTCGTCTTTGTAGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATAC  |
| sADg-rGFP_AAA              | eSL_AAA_T7F           | CTAATACGACTCACTATAGGGGGCGAAAGGGGGATG                         |
|                            | eSL_AAA_RV            | GCATGCGCCAAGCTTC                                             |
| ADg (L1)                   | sADg-rGFP_AAA_T7F     | CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCC                          |
|                            | sADg-rGFP_AAA_RV      | AGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATATATTCCACCCGAGGCGTGCAGTGCTTC     |
| ADg (L2)                   | sADg-rGFP_A200_01_T7F | CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCCGAGTGGGTG                 |
|                            | sADg-rGFP_A200_01_RV  | GTAGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATATATTCCACCCACTGCGGCG           |
| ADg (L4)                   | sADg-rGFP_A200_02_T7F | CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCCGAGTGGGTG                 |
|                            | sADg-rGFP_A200_02_RV  | TAGGTGGGATACTATACCACGAATGGTATATATTCCACCCACTGCGGCG            |
| ADg (L5)                   | sADg-rGFP_A200_04_T7F | CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCCGAGCTGGTG                 |
|                            | sADg-rGFP_A200_04_RV  | GGTGGGATACTATACCACGAATGGTATATATTCCACCCAGCTGCGGCG             |
| sAD-rGFPex_AAA<br>GFPs RNA | sADg-rGFP_A200_05_T7F | CTAATACGACTCACTATAGGGAAGCACTGCACGCCGAGCTCGTG                 |
|                            | sADg-rGFP_A200_05_RV  | GTGGGATACTATACCACGAATGGTATATATTCCACGAGCTGCGGCG               |
| Rluc W104X RNA             | sADg-rGFPex_AAA_RV    | CCTGAAGTGGGATACTATACCACG                                     |
|                            | GFPs RNA_T7F          | CTAATACGACTCACTATAGGGTGAATGGCCACAAGTTCAG                     |
| Rluc W104X Eco_FW          | GFPs RNA_RV           | TAGCGTGAGAAGCACTGCAC                                         |
|                            | Rluc W104X_Bam_RV     | GCTAGGAATTCACCATGGCTTCCAAGGTGTAC                             |
| Rluc W104X_FW              | Rluc W104X_R01        | GAAGGATCCTTACTGCTCGTTCCTTC                                   |
|                            | Rluc W104X_R02        | CTCACCGCTTAGTTTCGAGCTG                                       |
| GFP mut                    | Rluc W104X_Koz_T7F    | CAGCTCGAACTAAGCGGTGAG                                        |
|                            | Rluc W104X_R02        | CTAATACGACTCACTATAGGGACCATGGCTTCCAAGGTGTAC                   |
|                            | GFPmut_RV             | TTACTGCTCGTTCCTTCAGCACG                                      |
|                            |                       | GAGAAGCACTGCACGCCCTTTGCTCAGGGTGGTC                           |

【表3】

**DNA oligonucleotides  
for construction of expression plasmid**

| target         | name             | sequence (5'→3')                                               |
|----------------|------------------|----------------------------------------------------------------|
| ADg-GFP_A200   | ADg-GFP_A200 F1  | GGGTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTATAGTATCC                   |
|                | ADg-GFP_A200 R1  | TGACCACCCTGAGCTGCGGAGGTGGGATACTATAACAAC                        |
|                | ADg-GFP_A200 F2  | CTAAGATCTGGGTGGAATAGTATAACAATATG                               |
|                | ADg-GFP_A200 R2  | CTAAAGCTTAAAAATGACCACCCTGAGCTGCG                               |
| ADg-rGFP_A200  | ADg-rGFP_A200 F1 | GGGAAGCACTGCACGCCGAGCGGGTGGAAATAGTATAACAATATG                  |
|                | ADg-rGFP_A200 R1 | AGGTGGGATACTATAACAACATTTAGCATATTGTATATATTCC                    |
|                | ADg-rGFP_A200 F2 | CTAAGATCTGGGAAGCACUGCACGCCG                                    |
|                | ADg-rGFP_A200 R2 | CTAAAGCTTAAAAAGGTGGGATACTATAAC                                 |
| sADg-GFP_A200  | sADgGFP F        | GCTAGAGATCTGGGTGGAATAGTATACCATTCGTG                            |
|                | sADgGFP R        | GCTAGAAGCTTAAAAATGACCACCCTGAGCTG                               |
| sADg-rGFP_A200 | sADgrGFP F       | GATAAAGATCTGGGAAGCACTGCACG                                     |
|                | sADgrGFP R       | GCTAGAAGCTTAAAAAGGTGGGATACTATACCACG                            |
| ADg-rGFP_A173  | ADg-rGFP_A173 F  | GCTATAGATCTGTCCACGAGGTGGGCCAGGGGTGGAATAGTATAAC                 |
|                | ADg-rGFP_A173 R  | CCGATAAGCTTAAAAAGGTGGGATACTATAACAACATTTAGCATATTGTATATATTCCACCC |
| GFP mRNA W58X  | 5'-GFP F         | GCATGCTCGAGGGGCCGATGGTGAGC                                     |
|                | 5'-GFPW58X R     | CAGGGTGGGCTAGGGCACAGG                                          |
|                | 3'-GFPW58X F     | CCTGTGCCCTAGCCCACCTG                                           |
|                | 3'-GFP R         | GGTACAAGCTTTTCACTTGACAGCTCATCCA                                |

【表 4】

**DNA oligonucleotides  
for RT-PCR**

|                        | name                  | sequence (5'→3')                        |
|------------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| RT                     | oligodT               | GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT  |
| nested PCR 1st         | GFP R1 for edit check | GGCCACGCGTCGACTAGTAC                    |
| nested PCR 2nd         | GFP R2 for edit check | TCACTTGTAAGCTCATCCA                     |
| nested PCR 1st and 2nd | GFP F for edit check  | CTAATACGACTCACTATAGGGATGGTGAGCAAGGGCGCC |

【表 5】

**DNA oligonucleotides  
for qPCR**

| target       | name                | sequence (5'→3')         |
|--------------|---------------------|--------------------------|
| ADg-GFP_A200 | sADgrGFP F for qPCR | GAAGCACTGCACGCCG         |
|              | sADgrGFP R for qPCR | GGTGGGATACTATACCACG      |
| GAPDH        | GapDH F for qPCR    | CCTGCACCACCAACTGCTTAGC   |
|              | GapDH R for qPCR    | GATGGCATGGACTGTGGTCATGAC |

【表 6】

## sequences of RNA

| NAME                    | length (nt) | Sequence (5'→3')                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADg-GFP_A200 RNA        | 68          | GGGUGGAAUAGUUAACAAUAGCUAAUUGUUGUUAUAGUUAUCCACCUCCGACGUCAGGGUGGUCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 3'-antisense RNA        | 19          | CCGCAGCUCAGGGUGGUCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 5'-antisense RNA        | 22          | GGGAAGCACUGCACGCCGACG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| ADg-rGFP_A200 RNA       | 71          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAACAAUAGCUAAUUGUUGUUAUAGUUAUCCACCU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| AD-guide rRluc_A311 RNA | 62          | GGGUUACAGCAGCUCGAACCAAGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| sADg-GFP_A200 RNA       | 59          | GGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCUCCGACGUCAGGGUGGUCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| sADg-rGFP_A200 RNA      | 62          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| sADg-rGFP_AAA           | 62          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| sADg-rGFPex_AAA         | 85          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCUCCAGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| sADg-rGFP_A200_0        | 65          | GGGAAGCACUGCACGCCGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCUACG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| ADg (L1)                | 64          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCUAC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| ADg (L2)                | 63          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCUA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| ADg (L4)                | 61          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| ADg (L5)                | 60          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| sADg-GFP_A173           | 69          | GUCACCAAGGUGGCGCGGGUGGAAUAGUUAACAAUAGCUAAUUGUUGUUAUAGUUAUCCACCUU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| sADgGFP                 | 61          | GGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCUCCGACGUCAGGGUGGUCAU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| sADgrGFP                | 64          | GGGAAGCACUGCACGCCGACGCGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUAUAGUUAUCCACCUU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| GFP RNA                 | 720         | AUGGUGAGCAAGGGCGCCGAGCUGUUCACCGGCAUCGUGCCCAUCCUGAUCGAGCUGAAUGGCGAUGUGAA<br>UGGCCCAAGUUCAGCGUGAGCGGCGAGGGCGAGGGCCAUCCGACGCGAAGCUGACCCUGAAGUUC<br>AUCUGCACACCGGCAAGCUGCCUGUGCCUGGCGCCACCCUGGUGACACCCUGAGCUGACGGCGUGCAGU<br>GCUUCUCACGCUACCCGAUCACAUAGAGCAGCAGCAGUUCUUAAGAGCGCCAUCCUGGUGAGGGCUAUC<br>CAGGAGCGCACCAUCUUCGAGGAGUACGCGCAACUACAAGUCGCGCGCGAGGUGAAGUUCGAGGGCGA<br>UACCCUGGUGAUAUCGACGAGCUGACCGGCCAGAUUUAAGGAGGAUGGCAACAUCCUGGGCGAAUAGA<br>UGGAGUACAAUACAACGCCGACAAUGUGUACAUCAUGACCGACAAAGGCGAAGAUUGGCAUAGUUAU<br>UCAAGAUCCGCGCACAUCAUGGAGGAGCGAGCUGGUGAGCUGGCGGACCAUACACGAGAAUACCCCAUC<br>GGCGAUGGCCUUGUGCUGCGUGGCCGAUUAACCAUACUUGUCCACCCAGAGCGCCUGUCCAAAGGACCC<br>ACGAGAAGCGCGAUCACAUCAUACUUGGCCUUCGUGACCGCCGCCCAUACCCACGGCAUGGAUGAG<br>CUGUACAAGUGA                                                                                                                                                                                                                                    |
| GFPs RNA                | 160         | GGGUGAAUGGCCACAAUUCAGCGUGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCU<br>GAAGUUCAUUCGACACCGGCAAGCUGCCUGUGCCUGGCCACCCUGGUGACCAACCCUGAGCUACGGC<br>GUGCAGUGUUCUACCGUA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Rluc W104X RNA          | 942         | GGGACCAUGGCCUCCAAAGGUGUACGACCCCGAGCAACGCAACGCAUGAUCACUGGGCCUACUGGUGGG<br>CUCGCGUACAGCAAAUAGAGCUGGUGGACUCCUUAUCACUACUUAUAGUUAUCCGAGAGCAGCCGAGAACG<br>CCGUGAUUUUUCUGCAUGGUAACGUGCCUCCAGCUACCUUGGAGGGCAGCUGGCGCUCACUAGCAGGCC<br>CGUGGCCUAGAUCAUACUCCUGAUCUAGUACGGAUUGGGAUAGUCCGCGAAGAGCGGGAUUGGCCUACA<br>GCCUCCUGGAUCACUACAGUACUACCGGCUUAGUUCGAGCUGCUGAACCUCUCCAAAGAAAUACUUAUUG<br>UGGGCCACGACUGGGGGGCUUGUCUGGCCUUAUACUACUACUACGAGCACCAGACAAGAUCAAGGCCAUC<br>GUCCAUGCUGAGAGUUCUGGAGCUGAUCGAGUCCUGGGACGAGUGGCCUGAUCAGGAGGGAUAGC<br>CCCUGAUCAGAGCAAGAGGGCGAGAAAUUGGUGUUGAGAAUACUUCUUCGUGGAGCAGCUGCCCA<br>GCAAGAUCAUGCGGAACUGGAGCUGAGGAGUUCGUGGCCUACUUGGAGGCCAUUCAGAGGAGAGGGCGAG<br>GUUAGACGGCCUACCCUUCUCCUGGCCUCCGAGAUCCUUCUUAAGGGAGGCGAAGCCGACGUGUCC<br>AGAUUUGCCGCAACUACAAGGCCUACUUCGGGCCAGCGACGAGUCCUUAAGAUUUAUACGAGUCCGAC<br>CCUGGGUUCUUUUUCCACGCUAUUUGCAGGGAGCUAAGAGUUCUUAACACCGAGUUCUGAAGGUGAA<br>GGGCCUCCACUUCAGCCAGGAGGAGCGUCCAGAUAAAUGGGAUAGUACUACAAGAGCUUCGUGGAGCGCG<br>UGCUGAAGAACGACGAGUA |
| eSL_AAA RNA             | 196         | GGGGGCGAAAGGGGGAUGUGCUGCAAGGCGAUUAAGUUGGUAACGCCAGGGUUUUCACGACGACGCU<br>GUAAAACGACGGCCAGUAAUUCGCCUCCGAGUCCGUAAAGUGGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUA<br>GUUACCCACCUACUCUGACGAAGCUUGGCCGCAUGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| eSLr_AAA RNA            | 196         | GGGGGCGAAAGGGGGAUGUGCUGCAAGGCGAUUAAGUUGGUAACGCCAGGGUUUUCACGACGACGCU<br>GUAAAACGACGGCCAGUAAUUCGCCUCCGAGUCCGUUUCUGGUGGUGGAAUAGUUAUACCAUUCGUGGUUA<br>AGUUAUCCACCUACAAGACGAAGCUUGGCCGCAUGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| GFPmut RNA              | 154         | GGGUGAAUGGCCACAAUUCAGCGUGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCU<br>GAAGUUCAUUCGACACCGGCAAGCUGCCUGUGCCUGGCCACCCUGGUGACCAACCCUGAGCAAGGGC<br>GUGCAGUGCUUCU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| AcGFP W58X RNA          | 720         | AUGGUGAGCAAGGGCGCCGAGCUGUUCACCGGCAUCGUGCCCAUCCUGAUCGAGCUGAAUGGCGAUGUGAA<br>UGGCCCAAGUUCAGCGUGAGCGGCGAGGGCGAGGGCCAUCCGACGCGAAGCUGACCCUGAAGUUC<br>AUCUGCACACCGGCAAGCUGCCUGUGCCUAGGCCACCCUGGUGACCAUCCUGAGCUGACGGCGUGCAGU<br>GCUUCUCACGCUACCCGAUCACAUAGAGCAGCAGCAGUUCUUAAGAGCGCCAUCCUGGUGAGGGCUAUC<br>CAGGAGCGCACCAUUCUUCGAGGAGUACGCGCAACUACAAGUCGCGGCCGAGGUGAAGUUCGAGGGCGA<br>UACCCUGGUGAUAUCGACGAGCUGACCGGCCAGAUUUAAGGAGGAUGGCAACAUCCUGGGCGAAUAGA<br>UGGAGUACAAUACAACGCCGCAAAUGUGUACAUCAUGACCGACAAAGGCGAAGAUUGGCAUAGUUAU<br>UCAAGAUCCGCGCACAAUUCGAGGAGGAGCGAGCUGGUGGCGGACCAUACACGAGAAUACCCCAUCC<br>GGCGAUGGCCUUGUGCUGCGGCCGAUUAACCAUACUUGUCCACCCAGAGCGCCUGUCCAAAGGACCCCA<br>ACGAGAAGCGCGAUCACAUCAUACUUGGCCUUCGUGACCGCCGCCGCAUACCCACGGCAUGGAUGAG<br>CUGUACAAGUGA                                                                                                                                                                                                                                    |

【0177】

(AD-gRNAならびに 標的RNAの調製法)

まず、AD-gRNAはin vitro転写法にて合成した。In vitro転写用テンプレートdsDNAを合成オリゴヌクレオチドを用いて常法に従って合成した。一般には、T7プロモーター配列を含むフォワードDNAオリゴヌクレオチド1μMと、リバーズDNAオリゴヌクレオチド1μMをアニーリングバッファ(50 mM Tris-HCl [pH 7.6]、50 mM NaCl)で混合して後、95℃で3分間変性後、室温で15分間冷却してアニーリング反応を行った。dsDNAテンプレートを作製するために、アニーリング製品をKlenowポリメラーゼ(New England BioLabs)を用いて伸長した。得られたdsDNAをフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿にて精製した。この精製dsDNAをテンプレートとして使用して、in vitro転写反応をAmpliSc

10

20

30

40

50

ribe T7 Kit (Epicentre Biotechnologies) を用いて製造者プロトコルに従って行った。反応液をフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿して、8 M Ureaを含む 5% ポリアクリルアミドゲルにて変性して AD-gRNAsを精製した。標的RNAは、dsDNAテンプレートを標準PCR反応 (PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TAKARA BIO)) によるPCRによって調製した後、上述したようにin vitro転写と精製を行った。全てのDNAオリゴヌクレオチドとRNAサンプルの配列は表2～表6に表示している。

#### 【0178】

(組換えhADAR2の調製法)

組換えhADAR2は、ヒトADAR2のためのコーディング領域をcDNA clone (clone ID 601460 5, Open Biosystems) からPCRで増幅し、N-末端His-Expressタグ付融合タンパク質をクローン後、Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research) を用いてINVSc1イースト細胞に形質転換した。得られた形質転換体は液体培地で培養し、組換えhADAR2をHisTrap HPカラム (GE Healthcare) で精製した。hADAR2を含む分画を集めて、保存用バッファ (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、5% glycerol、1 mM DTT) で50-kDaの分子量カットオフFloat-A-Lyzer G2 (Spectra/Por) で投石した。精製したhADAR2はDC protein Assay Kit (BioRad) を用いて製造者プロトコルに従って定量した。

#### 【実施例11】

#### 【0179】

(In vitro編集アッセイ)

gRNAsとtarget RNAの複合体は、900 nM AD-gRNAと300 nM標的RNAを80℃で3分間加熱し、次いでアニーリングバッファ (10 mM Tris-HCl [pH 7.6]、150 mM NaCl) を用いて1℃/10秒の割合で25℃に徐冷した。編集反応は次のように行った。得られた複合体5 nMと濃度を変えた精製hADAR2を反応バッファ (20 mM HEPES-KOH [pH 7.5]、100 mM NaCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM DTT、0.01% TritonX-100、5% glycerol、1 U/μl Murine RNase Inhibitor [New England BioLabs]) 20 μlで混合した後、37℃で2時間培養した。反応終了後、反応したRNAをフェノール／クロロホルム抽出・エタノール沈殿をした。その後、RNAペレットをTEバッファ5 μlに溶解した。反応RNAからcDNAを精製RNAから得るために、PrimeScript II Reverse Transcription Kit (TAKARA BIO) を用いて逆転写した。cDNAは、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TAKARA BIO) を用いて標準プロトコルに従ってPCR増幅した。各部位での辺雌雄効率は次のようなダイレクトシーケンシングによって分析した。ゲル精製PCR製品10 ngをリバースプライマーとBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でシーケンスし、次に3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンスクロマトグラフィーを行った。各部位での編集割合は次のようにして算出した： $A / (A + G)$  (式中、AとGは、Sequence Scanner software ver. 1.0 (Applied Biosystems) で測定したアデノシンとグアノシンのピーク高をそれぞれ意味する)。

#### 【実施例12】

#### 【0180】

(in vitro翻訳と結合させたルシフェラーゼレポーターアッセイを用いたin vitroコドン修復実験)

in vitroコドン修復実験用レポーターは、レニラルシフェラーゼmRNA (Renilla luciferase mRNA (Rluc-WT)) に基づいて設計した。このレポーターmRNA (Rluc-W104X) は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、Trp104 (UGG) 内のG311を A311に変異して調製した。このRluc-W104Xレポーターを用いると、全長ワイルドタイプRlucトランスクリプトが合成され、A311がI311に編集された。In vitro編集反応と翻訳反応を連続して行った。まず、5 μM Rluc-W104Xと15 μM ADg-rLuc\_A311を、アニーリングバッファを用いて一緒に80℃で3分間加熱し、続いて1℃/10秒の割合で25℃に徐冷をしてアニールした。その後、レポーター・gRNA複合体0.5 μMを反応バッファ内で37℃で2時間処理して1.25 μM hADAR2と編集反応を行った。並行して、コントロールサンプル (gRNAを含まない) を同一反応で処理した。

## 【0181】

編集したRNAサンプルはフェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿をして回復した。活性なRlucが編集されたレポーター mRNAから翻訳できるかどうかを評価するために、*in vitro*翻訳を、編集反応で得られたレポーターRNA 1 µgを用いてラビット網状赤血球ライセート20 µlで行った。37℃で1時間翻訳した後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて化学発光法を製造プロトコルに従って行い、発光を分光光度計で測定した。反応を同時に行う場合、5 µM Rluc-W104Xと15 µM ADg-rLuc\_A311と1.25 µM hADAR2をラビット網状赤血球ライセート20 µlで十分に混合し、37℃で20分間培養した。次いで、ルシフェラーゼアッセイを上記条件の下で行った。

## 【実施例13】

## 【0182】

(AD-gRNA発現プラスミドの作製)

AD-gRNA発現プラスミドは、H1 RNA polymerase IIIプロモーターに基づいて、短鎖ヘアピンRNAsやmiRNAsなどの細胞内RNAsを発現するために使用されるpSUPER.neo (Oligoengine) を用いて構築された。AD-gRNAsをコードするDNAインサートを調製する際に、テトラウリジンをAD-gRNA配列の3'末端に挿入して特定位置のpol IIIの転写を終了させた。ベクターへのクローニングは、Hind IIIとBgl II制限部位を5'末端と3'末端にそれぞれ導入することによって促進された。DNAインサートは表2～表6に示す合成オリゴヌクレオチドを用いて作製された。各DNAインサートはpSuper.neoベクターにクローンされ、得られたプラスミドの配列はDNAシーケンシング分析によって確認した。最後に、転写に使用する発現プラスミドはPlasmid Mini kit (Qiagen) を使用して製造者プロトコルに従って調製した。

## 【実施例14】

## 【0183】

(細胞培養)

HEK293細胞を、10%ウシ胎児血清を追加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma) に採取した。hADAR2とAcGFPを2方向性プロモーターからTet-on系の制御の下で同時に発現させたtet-ADAR2細胞を発明者の研究室で確立した。tet-ADAR2細胞は、10% Tet system-approvedウシ胎児血清 (Clontech)、1 µg/mL puromycin、100 µg/mL G418 (Sigma) を補充したDMEM内に単層として5% CO<sub>2</sub>の存在下37℃で培養した。tet-ADAR2細胞をDox5 µg/mLを追加した上記培地で培養してADAR2とAcGFPの発現を誘導した。

## 【実施例15】

## 【0184】

(AD-ガイドRNAの細胞内活性の分析)

Tet-ADAR2細胞( $1.6 \times 10^5$ ) を5 µg/mL Doxを含む培地を入れた35-mmディッシュに追加した。細胞が約80%のコンフルエンスになったときに、X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) を用いてAD-gRNA 2 µgでトランスフェクトした。72時間トランスフェクトした後、tet-ADAR2細胞内でhADAR2を用いて同時発現させたAcGFP RNAのA100での編集効率は次のように分析した。全RNAは、トランスフェクトした細胞からSepasol RNA Isolation Reagent (Nacalai Tesque)を用いて製造者のプロトコルに従って抽出した。その後、RNAサンプル(30 µg) を10 U DNase I (Takara Bio) で37℃で3時間処理した後、フェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿をした。精製RNA (0.5 µg) をアダプターリンクオリゴ (dT) 17プライマーとTranscriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて製造者プロトコルに従って逆転写をした。得られた全RNAをテンプレートとして使用して、AcGFP cDNAをAcGFP-特異的プライマー (AcGFP\_F and AcGFP\_R) を用いてPCR増幅した。A100部位でのA-I RNA編集効率は、ダイレクトシーケンシング法で分析した後、AとGの相対的ピーク高を定量し、各編集割合を(A + G) のピーク高で割ったGのピーク高に基づいて算出した。

## 【実施例16】

## 【0185】

(AD-gRNAsによる細胞内コドン修復実験)

in vitroコドン修復実験では、G173がA173に変換してストップコドンのコドンW58を変異した変異体GFP mRNA (AcGFP-W58X)を設計して、AD-gRNAが細胞内で機能性遺伝子発現を調節できるかどうかを決定した。AcGFP-W58X発現プラスミドをpcDNA3.1発現ベクター (In vitrogen) に基づいて構築した。さらに、hADAR2発現プラスミドをPCR-amplified hADAR2 cDNAを pcDNA3.1にクローンすることによって構築した。hADAR2、AcGFP-W58X、AD-gRNA発現ベクター各100 ngをサブコンフルエンスなHEK293細胞内に共トランスフェクトした。編集効率はトランスフェクト72時間後に行った。また細胞内GFP蛍光の回復は蛍光顕微鏡で分析した。

【実施例17】

10

【0186】

本実施例は、本発明に係る編集ガイドRNAを細胞内RNA変異導入した培養細胞内で機能するかを検証した例である。まず、in vitroで編集誘導活性を示した4種類の編集ガイドRNA (ADg-GFP\_A200、ADg-rGFP\_A200、sADg-GFP\_A200、sADg-rGFP\_A200; 図36参照)の細胞内発現プラスミドを構築した。発現ベクターには市販のpSUPER.neo (Oligoengine)を用いた。また、ADAR発現細胞としてtet-ADAR2細胞 (HEK293細胞にADAR2発現遺伝子を組み込んで構築した細胞株。ドキシサイクリン濃度依存的にADAR2及びGFPを発現)を用いた。ドキシサイクリン存在下でtet-ADAR2細胞を培養し、ADAR2及びGFPの発現を誘導した後、各種編集ガイドRNA発現プラスミドを導入した (図37a)。培養後、標的部位であるA200 (図21参照)の編集割合は、ダイレクトシーケンシングによるGFP mRNAの編集解析結果により解析した。つまり、細胞から抽出したGFP mRNAを逆転写し、配列解析を行った結果、細胞から抽出したGFP RNAのA200は、編集ガイドRNAを導入した時のみ編集のシグナルが検出された (図37b)。また、その時の編集割合を得られたクロマトチャートのピークの高さの比 (G/A+G) から算出した結果、高いサンプルでおよそ40%編集されていた (図37c)。以上の結果から、編集ガイドRNAが細胞内ADARを誘導し、標的部位に変異を導入できることを実証した。また、この結果は、ADARを発現している細胞であればプラスミド導入のみで合目的な変異導入が可能であることも同時に示している。

20

【実施例18】

【0187】

mRNA上のイノシン (I) が、翻訳の際にグアノシン (G) として認識されることから、このA-I変異によるコドン改変により、細胞内標的タンパク質の機能を制御できることになる。そこで、本実施例では、本発明に係るRNA変異導入法がタンパク質機能発現を制御できるかどうかを明らかにした。

30

【0188】

具体的には、GFP mRNA (720 nt)の58番目のTrpコドン (UGG)を終止コドン (UAG)に改変したレポーターmRNA (GFP W58X mRNA)を用いて、RNA変異導入により終止コドンをUIGに変異させることで、成熟型のGFPが細胞内で翻訳されるかを検証した (図37a)。まず、標的終止コドンをTrpコドンに改変できるよう、A173を標的とする編集ガイドRNA (ADg-rGFP\_A173)を設計し、pSuper.neoを用いて細胞内発現プラスミドを構築した。その後、ADAR2発現プラスミド (pcDNA3.1 (-) Hygro\_His-ADAR2)、レポーターRNA発現プラスミド (pcDNA3.1 (-) Hygro\_AcGFPW58X)とHEK293細胞に共トランスフェクションした。培養後、編集誘導により蛍光を発する細胞を蛍光顕微鏡により確認した。その結果、編集ガイドRNA発現プラスミドを導入した細胞群にのみ、強い蛍光を発する細胞が検出された (図38)。以上の結果より、編集ガイドRNAを用いたRNA変異導入により、標的タンパク質の発現制御が可能であることを実証した。

40

【実施例19】

【0189】

コラーゲンコートした35-mm dishに $4.0 \times 10^5$ 個のTet-ADAR2細胞をピューロマイシン $1 \mu\text{g/mL}$ 、G418  $100 \mu\text{g/mL}$ 、Dox  $5.0 \mu\text{g/mL}$ を含むTet血清培地中で、 $37^\circ\text{C}$ 、5.0%  $\text{CO}_2$ 条件下で培養した。80%コンフルエントになるまで培養した細胞を $1.6 \times 10^5$  cells/wellとなるよう

50

に6-well plateに継代した。48時間培養後、FuGENE HP Transfection Reagent (Roche)を用いて各々のguide RNA発現プラスミド (pSuper-guide 3-mini, pSuper-guide 3r-mini, pSuper-guide 3-Glu, pSuper-guide 3r-Glu) を2 $\mu$ gトランスフェクションし72時間培養した。その後、1000 $\mu$ Lのセパゾール RNA I Super G (ナカライ)を用いて全RNAを抽出し、10 U Recombinant DNaseI (TaKaRa)を用いて37 $^{\circ}$ Cで1時間DNase処理を行った。全RNA産物をフェノール/クロロホルム処理、酢酸ナトリウム存在下のエタノール沈殿により精製した。Total RNA 0.5 $\mu$ g、2.5 $\mu$ M Oligo (dT)<sub>17</sub>、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)を用いて変性 80 $^{\circ}$ C、3分、急冷、アニーリング 65 $^{\circ}$ C、10分、伸長反応 55 $^{\circ}$ C、300分、加熱処理85 $^{\circ}$ C、5分の条件で逆転写反応を行い、cDNAを合成した。10倍希釈したサンプルを鋳型に用い、0.25 $\mu$ M AcGFP RNAf T7F01プライマー、0.25 $\mu$ M 3'-ADPプライマー、0.25 U PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いて1st PCR (変性 98 $^{\circ}$ C、10秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C、15秒、伸長反応 68 $^{\circ}$ C、60秒、35サイクル)を行った。400倍希釈した1st PCR産物を鋳型に用い、0.25 $\mu$ M RNAf T7F01プライマー、0.25 $\mu$ M AcGFP-RNAf-R01プライマーを用いてNested PCR (変性 98 $^{\circ}$ C、10秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C、15秒、伸長反応 68 $^{\circ}$ C、60秒、24サイクル)を行った。PCR反応後、10倍希釈した増幅産物を鋳型に用い、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems<sup>TM</sup>) と0.165 $\mu$ M RNAf T7F01プライマーを用いてシーケンシング反応 (変性 96 $^{\circ}$ C、10秒、アニーリング 50 $^{\circ}$ C、5秒、伸長反応 60 $^{\circ}$ C、30秒、25サイクル)を行った。得られたピークの高さの比 G/ (G+A) により編集割合を算出した。その後の操作 (RNA抽出以降) は上記と同様に行った。

10

20

**【実施例20】****【0190】**

35mm/GLASS BASE DISH (Glass 12 $\phi$ ) (IWAKI)に1.6 $\times 10^5$ 個のHEK293細胞を血清培地中で、37 $^{\circ}$ C、5.0% CO<sub>2</sub>条件下で48時間培養した。その後、X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche)を用いてADAR2発現プラスミドpcDNA3.1 (-) Hygro\_His-ADAR2、基質RNA発現プラスミド pcDNA3.1 (-) Hygro\_AcGFPW58Xおよび各guide RNA発現プラスミド pSuper-neo-guide 3r-miniW58XまたはpSuper-neo-guide 3r-GluW58Xを700 ngずつ形質導入し72時間培養した。その後、D-PBS (-) (ナカライ)で細胞を洗浄した後、共焦点蛍光顕微鏡を用いた観察を行った。

**【実施例21】****【0191】**

本実施例では、AD-gRNAと標的RNAの複合体が形成されていることをゲル・モビリティ・シフト・アッセイ (gel-mobility shift assay) にて確認した (図23)。ADg-GFT\_A200 (900 nM)とGFP mRNA断片 (300 nM; 160 nt) を80 $^{\circ}$ C、3分間アニールした後、アニーリングバッファー (10 mM Tris-HCl [pH 7/6]、150 mM NaCl) 中で25 $^{\circ}$ Cに10秒間に1 $^{\circ}$ Cの割合で徐冷した。徐冷後、8%ポリアクリルアミドで電気泳動し、エチジウムブロマ이드で染色した。第1レーンはGFP RNA、第2レーンはADg-GFP\_A200、第3レーンはアニールしたサンプルを示している。シフトしたバンドは矢じり印で示すように得られた結合体であると期待できる。

**【実施例22】****【0192】**

本実施例では、編集GluR2 RNAに基づくフレームワークを用いたAD-gRNAの構築を確認した (図24)。sADg-GFP\_A200とsADg-rGFP\_A200のin vitro編集生起活性は、RT-PCRした後、gRNA (上部パネル)、sADg-GFP\_A200 (中央パネル) またはsADg-rGFP\_A200 (下部パネル) なしのin vitro編集反応によって得られたGFP cDNAのシーケンシングクロマトグラフ図中のAとGピークから編集割合を算出して得た。結果は、3個の別々の実験からの平均値と標準偏差値で示した。

**【実施例23】****【0193】**

本実施例では、cis-基質RNAを用いて編集特異性を分析した (図25)。基質RNAの編

30

40

50

集特異性を調べるために、下記変異を用いた基質ヘアピン構造に基づいてeSL<sub>AAA</sub> RNAとeSLr<sub>AAA</sub> RNAを設計した。

【0194】

eSL<sub>AAA</sub> RNAは、標的編集部位に隣接するヌクレオチドをアデノシンに変異し、塩基対合を促進するためにウリジンをこの変異アデノシンの相補位置に導入することによって作製した。eSLr<sub>AAA</sub> RNAは、eSL<sub>AAA</sub> RNAの標的塩基アデノシンを含む3個のアデノシンを相補的ntで置換することによって作製した。eSL<sub>AAA</sub> RNAとeSLr<sub>AAA</sub> RNAの実際の配列は図25(a)に示す。図中、各アデノシンを認識しやすいように、標的編集部位をnt位置(0)で示し、隣接5'-アデノシンをnt位置(-1)、3'-アデノシンをnt位置(+1)と示す。

10

【0195】

これらの基質RNAを使用して、hADAR2とのin vitro編集反応を図23aの方法に従って実施した。次に、目的のアデノシンの編集効率を反応時間を変えてダイレクトシーケンシング法で分析した。得られたシーケンスクロマトグラフ図を図25(b)に示す。図中、各アデノシンの位置は、対応するnt位置番号で表している。加えて、ピークの高さから算出した編集割合は、各反応時間ごとにグラフにプロットした。図中、○印はnt位置(0)で観察された編集パーセンテージ、□印および△印はnt位置(-1)および(+1)でそれぞれ観察された編集パーセンテージを表している。データは3回別々に実験した結果の平均値と標準偏差値である。

20

【実施例24】

【0196】

本実施例では、AD-gRNA誘導RNA編集の隣接特異性を評価するために、GFPmut RNAを、GFP mRNA中のA200に隣接する隣接ntをアデノシンに変異させることによって作製した。図26において、ntA200はnt位置0として定義し、5'側ならびに3'側アデノシンはnt-1ならびにnt+1としてそれぞれ定義した。ADg-RNAに対しては、ADg-rGFP<sub>AAA</sub>をADg-rGFP\_A200の配列デザインに従って構築した。図26aは、GFPmut RNA上の標的編集部位周辺の配列ならびにADg-rGFP<sub>AAA</sub>の実際のヌクレオチド配列を含む配列デザインを示す。各部位での編集効率を分析するために、in vitro編集反応を図23に従って実施した。編集時間の違いに応じた編集効率の変化をグラフにプロットした。グラフ中、○印、△印ならびに□印はnt位置0、+1ならびに-1における編集パーセンテージをそれぞれ表している。データは3回別々に実験した結果の平均値と標準偏差値である。

30

【実施例25】

【0197】

本実施例では、塩基対合を追加導入したときのAD-gRNA誘導RNA編集の隣接特異性ならびに編集効率に対する効果を分析した。sADg-rGFP<sub>AAA</sub>中のADAR結合部位(図25)の回転自由度は、3'側に塩基対合を追加導入することによって抑制されるのではないかと調べた。sADg-rGFP<sub>AAA</sub>の3'側に5nt(5'-UCAGG-3')を追加導入して、塩基対合領域(四角で囲んだ領域)を伸長ように設計した。実施例24と同様の条件で、hADAR2とのin vitro編集反応を実施し、各部位での編集パーセンテージを分析した。

【実施例26】

40

【0198】

本実施例では、同時in vitro編集／翻訳反応を行った。図30aは反応の概略図である。図30bは、反応後、A311での編集効率を直接シーケンシングで分析した結果を示している。上部パネルはガイドRNAなし、下部パネルはADg-rRluc\_A311のシーケンスクロマトグラフィー図をそれぞれ表している。

【実施例27】

【0199】

本実施例では、tet-ADAR2細胞中のADg-GFP\_A200をRT-PCRならびに定量PCR(qPCR)した。サブコンフルエント(subconfluent)に増殖しているtet-ADAR2細胞をAD-gRNA発現プラスミドベクターを用いてトランスフェクトした。各時間培養した後、全R

50

N Aを抽出し、Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いたランダムヘキサマー (hexamer) プライマー (dN6プライマー) を用いて逆転写を行った。qPCRは、Power SYBR(R) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いたADg-GFP\_A200の特異的増幅のためにqADg\_FとqADg\_Rプライマーを用いて行った。全RNA量を定量するための内部標準としては、グリセルアルデヒド3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) もまたGAPDA-QFとGAPDH-QRプライマーを用いて定量した。qPCRの条件は次のとおりである：変性のための予備加熱 (95℃で10分間) ならびにLightCycler Nano System (Roche) による増幅 (95℃、15秒間；60℃、1分間；55サイクル)。分析ソフトウェアを用いて、公差閾値 (Ct: crossing threshold) を2nd derivative maximum methodによって蛍光増幅プロットから算出した。各サンプルの公差閾値差 (ΔCt) は次のようにして算出した：

$$\Delta Ct = Ct(AD-gRNA) - Ct(GAPDH)$$

ADg-RNAの相対発現量は、 $R = 2^{-\Delta Ct}$  によって推定し、グラフに表示した。

#### 【実施例28】

##### 【0200】

本実施例では、tet-ADAR2細胞中のhADAR2発現をウエスタンブロッティングで分析した (図33)。Tet-ADAR2細胞をドキシサイクリン (Dox) を0、0.05、0.1、0.5、1.5 ug/mL含有する培地で培養し、サブコンフルエントな細胞を採集した。ヘマトサイトメーターで計数後、細胞 $6.4 \times 10^4$ 個を20 μL SDS-PAGEサンプルバッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.6]、2% SDS、6% β-メルカプトエタノール、10%グリセロール) で溶菌した。各細胞溶菌液サンプル5 μLを8%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGE電気分解してタンパク質を分離し、PVDF膜上を電気泳動した。装填した溶菌液の量を標準化するために、膜を切断してhADAR2とβ-アクチンを同一膜上で同時に分析できるようにした。各膜切片は、hADAR2に対する1次抗体 (抗ADARB1、Sigma) とβ-アクチンに対する1次抗体ラビット由来抗アクチン抗体、Sigma) と培養し、続いてホースラディッシュペーパーオキシド結合抗ラビットIgG (Sigma) を用いて2次抗体との反応を行った。その後、EzWestLumi plus (ATTO) による化学ルミネッセンス反応を行い、タンパク質のバンドをLuminoGraph I (ATTO) で検出した。

#### 【実施例29】

##### 【0201】

本実施例は、tet-ADAR2細胞中でのAD-gRNAによって誘導される編集効率を示している。

#### 【実施例30】

##### 【0202】

本実施例は、編集基質RNAの異なる部位において生成したAD-gRNAの編集効率を示している。図35 (a) はAD-gRNA生成のためのヘアピン基質の分割線を示す。(b) は、標的RNA (GFP mRNA) の配列と、(a) で示した部位で分割することによってフレームワークから構築された5'-アンチセンスADg-RNAの配列を示す。ADg(L3) は、実施例14に示した実験で用いたsADg-rGFP\_A200と同じである。(c) は、各RNAの編集誘導活性を評価するために、編集アッセイを実施例16で示した同じ条件で行った。反応時間に応じたA200での編集効率の変化をグラフにプロットした。データは読みとした2回の実験の平均値と標準偏差値を表している。

#### 【産業上の利用可能性】

##### 【0203】

本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法は、その標的塩基アデノシンが存在するあらゆる標的RNAばかりではなく、かかる標的RNAに対する標的編集ガイドRNAを容易に設計・構築することができることから、ADAR機能を誘導する標的RNAと標的編集ガイドRNAとの二本鎖複合体を容易に設計・構築することができる。従って、本発明では、かかる二本鎖複合体にADARを作用させることにより、そのRNA編集能を誘導して標的塩基アデノシンをイノシンに変換することができる。その上、本発明は、生体外ばかりではなく、生体内においても利用できることから、創薬の研究開発における有用でかつ重要なツールとして利用

することが可能である。

#### 【0204】

本発明に係る部位特異的RNA変異導入方法は、糖鎖修飾部位やリン酸化部位、金属配位等の細胞内タンパク質の機能発現に関わるアミノ酸の変異に適用することができ、これにより細胞内タンパク質の機能を一時的に制御する新たな方法論を提供できる。本発明は、標的編集ガイドRNAを用いたRNA変異導入技術による生体内タンパク質機能制御法を一般化することで、生命科学分野の研究発展に大きく貢献できる分子科学技術を提供する。

#### 【0205】

また、現在まで、siRNAによる標的タンパク質の発現抑制、またはアプタマーと呼ばれる機能性RNAによる標的タンパク質の機能制御を利用した核酸製剤が開発されている。一方で、mRNAの情報を変換し標的タンパク質の機能を改変する薬剤は未だ開発された例を見ない。したがって、本発明は、これまでにない機能や薬効を示す新規な核酸医薬品、例えば、抗筋ジストロフィー薬、抗多発性硬化症薬、抗アルツハイマー病薬、抗神経組織変性薬、抗パーキンソン氏病薬などの神経疾患薬や、抗がん薬などを生み出す可能性を秘めている。

10

#### 【符号の説明】

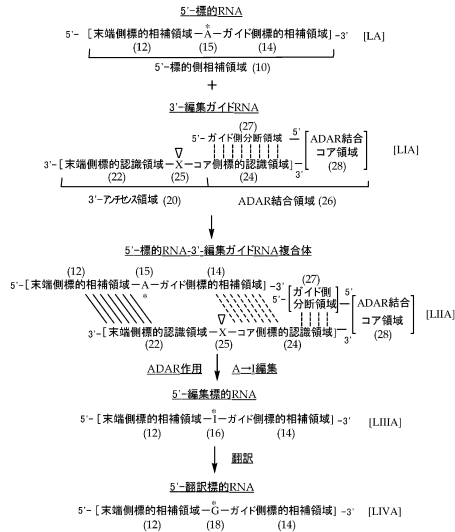
#### 【0206】

- |     |            |
|-----|------------|
| 1 0 | 5'-標的側相補領域 |
| 1 2 | 末端側標的相補領域  |
| 1 4 | ガイド側標的相補領域 |
| 2 0 | アンチセンス領域   |
| 2 2 | 末端側標的認識領域  |
| 2 4 | コア側標的認識領域  |
| 2 6 | ADAR結合領域   |
| 2 7 | ガイド側分断領域   |
| 2 8 | ADAR結合コア領域 |
| 5 0 | 3'-標的側相補領域 |
| 5 2 | 末端側標的相補領域  |
| 5 4 | ガイド側標的相補領域 |
| 6 0 | アンチセンス領域   |
| 6 2 | 末端側標的認識領域  |
| 6 4 | コア側標的認識領域  |
| 6 6 | ADAR結合領域   |
| 6 7 | ガイド側分断領域   |
| 6 8 | ADAR結合コア領域 |

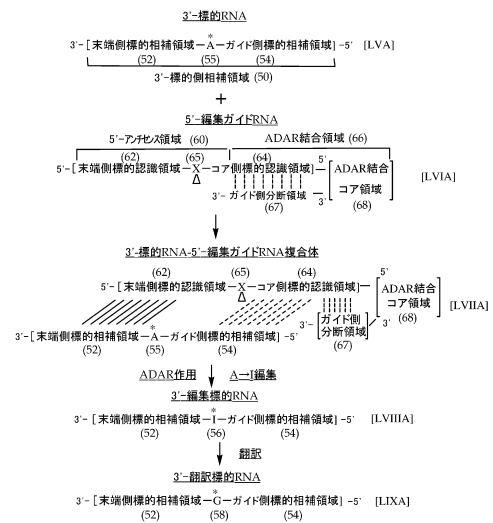
20

30

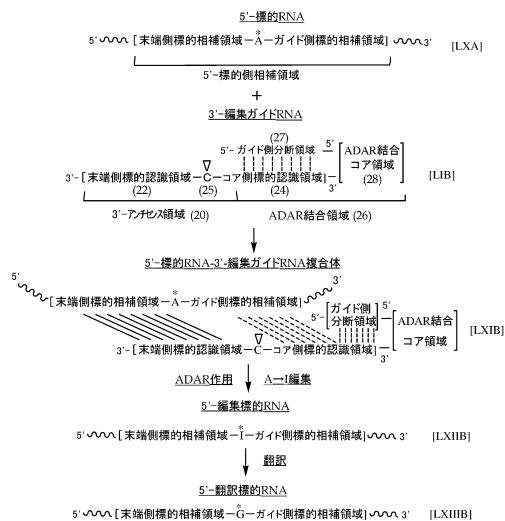
【図 1】



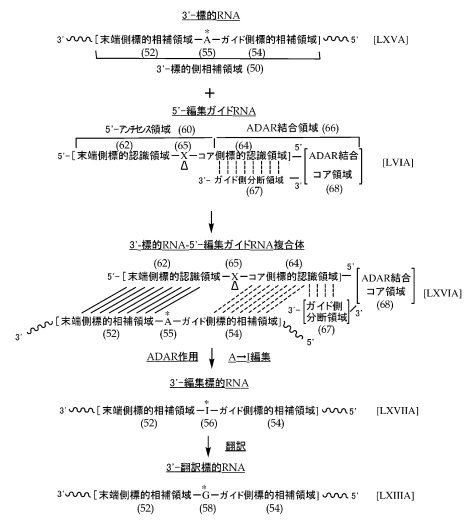
【図 2】



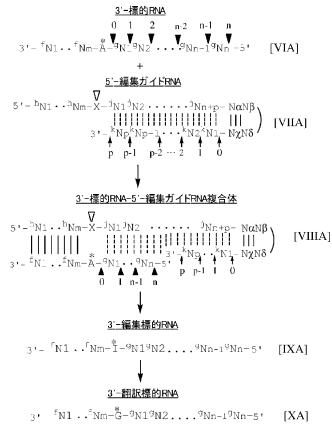
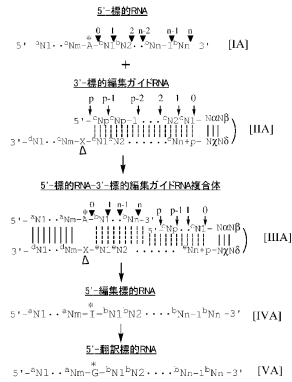
【図 3】



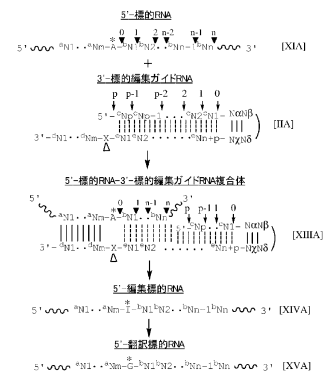
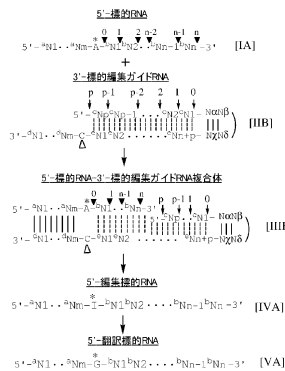
【図 4】



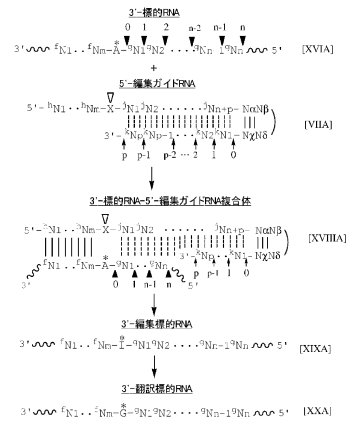
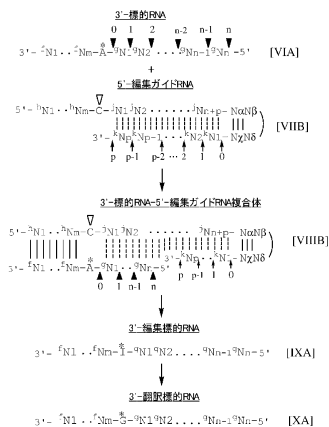
【图 6】



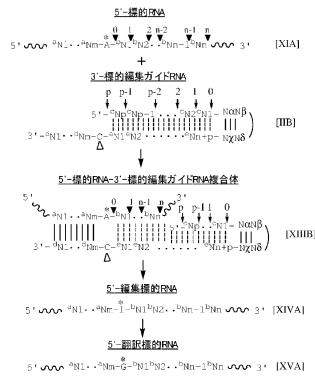
【図 9】



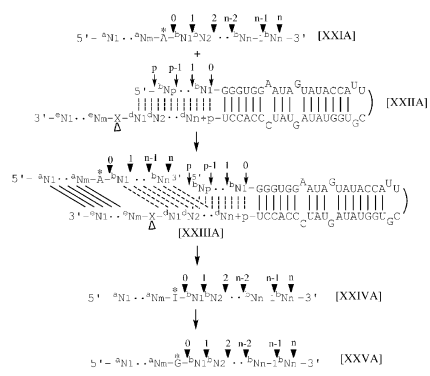
【図 10】



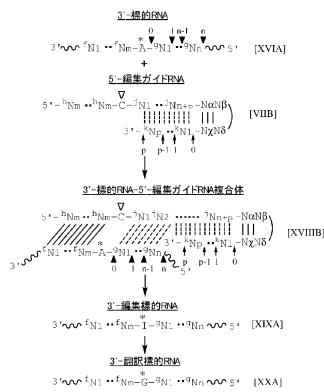
【図 1 1】



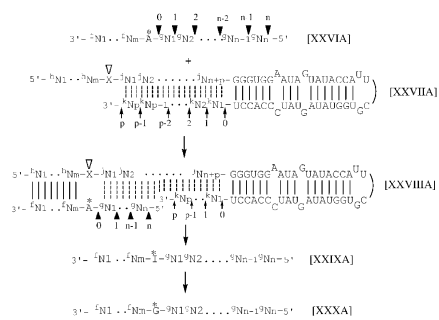
【図 13】



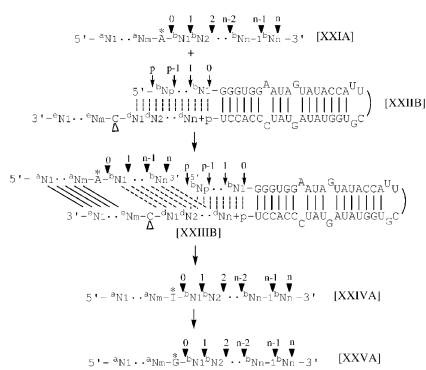
【図 1 2】



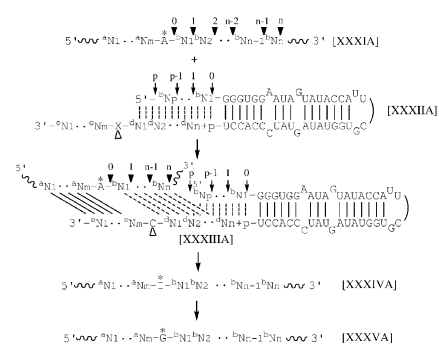
【図 14】



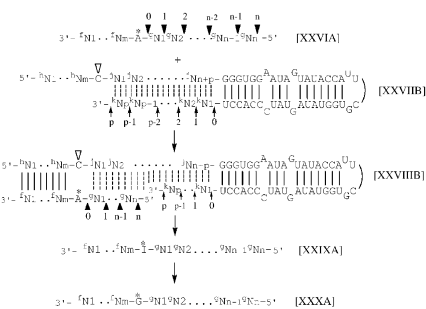
【図 15】



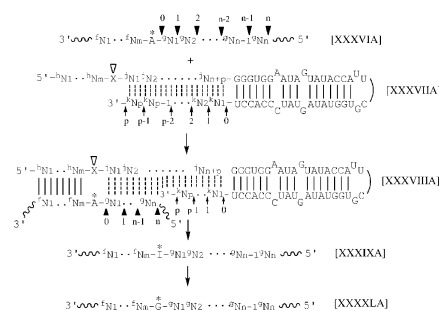
【図 17】



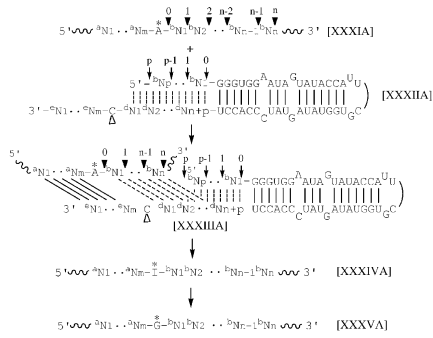
【图 16】



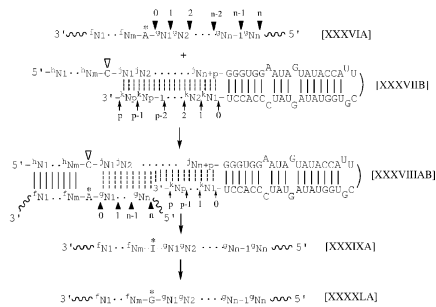
【図 18】



【图 2 1】

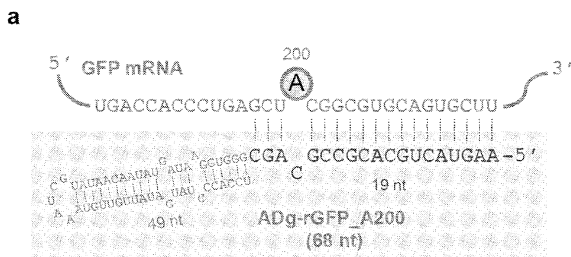
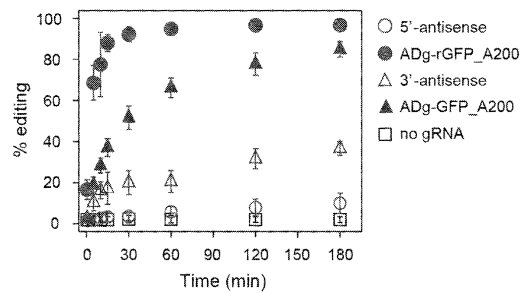


【図 20】

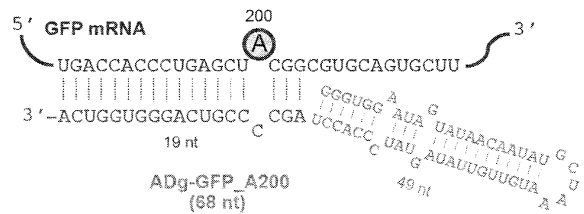


【図 2 2 A】

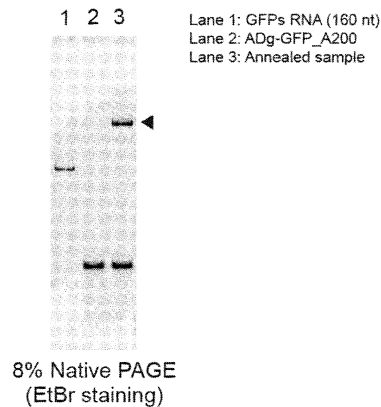
【図22A】

**b**

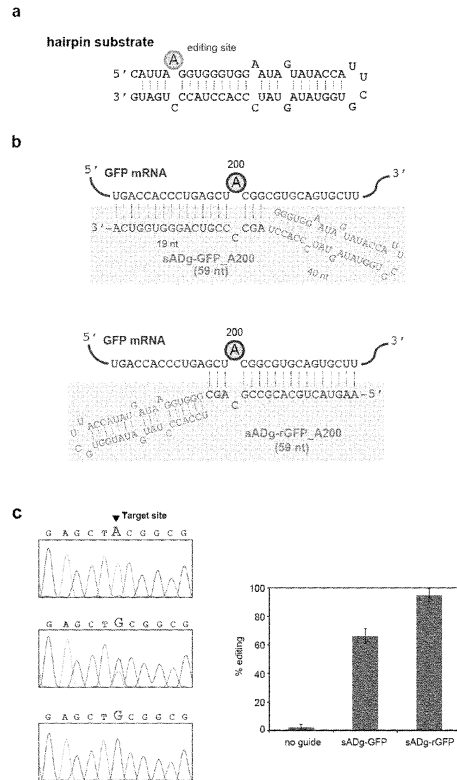
【图 2 2 B】



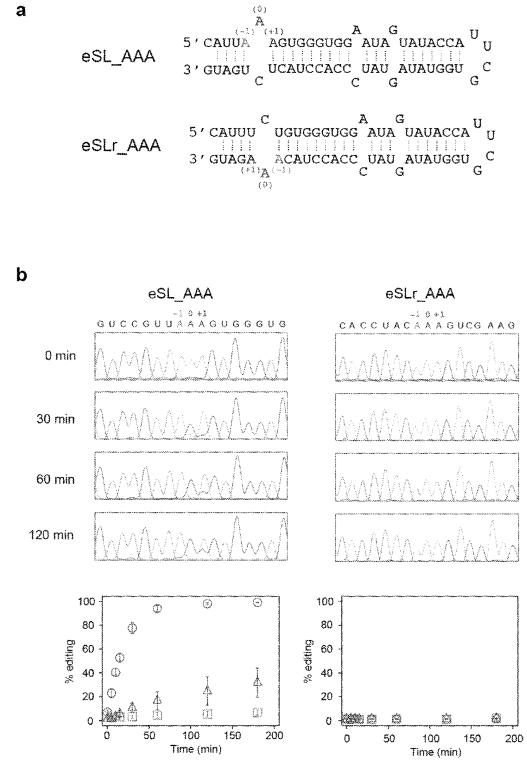
【図 2 3】



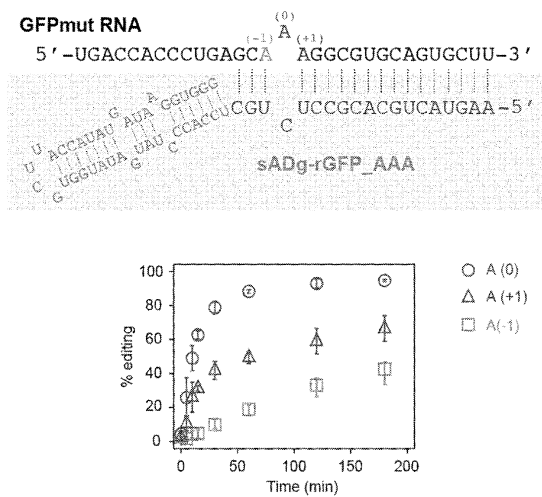
【図 24】



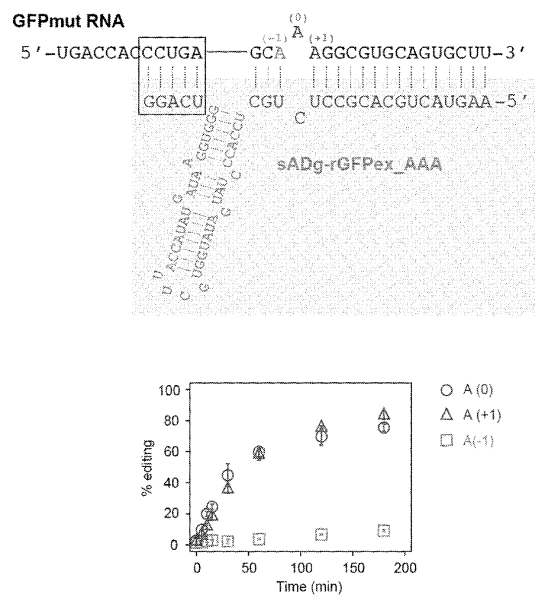
【図 25】



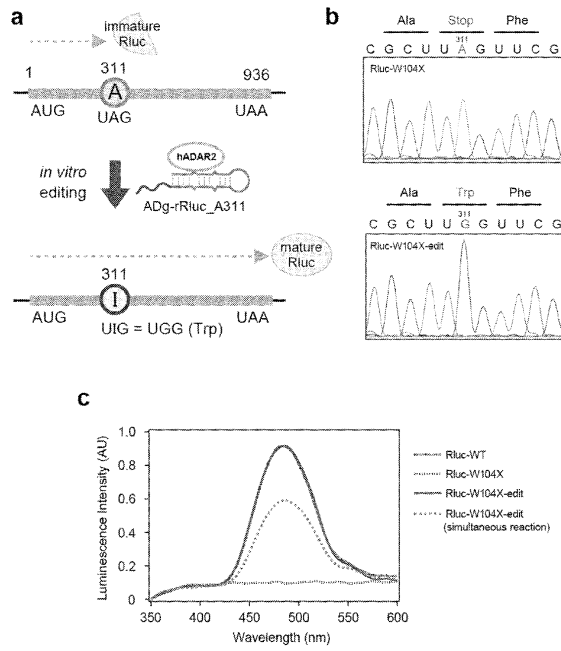
【図 26】



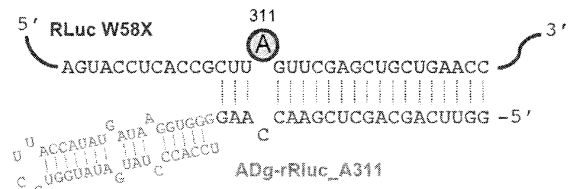
【図 27】



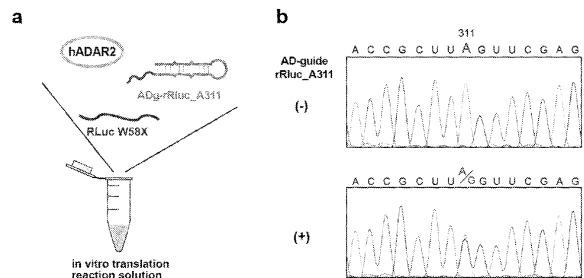
【図 28】



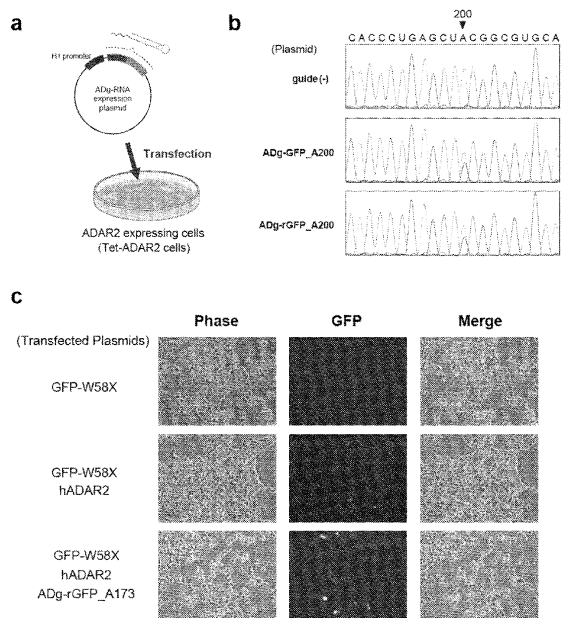
【図 29】



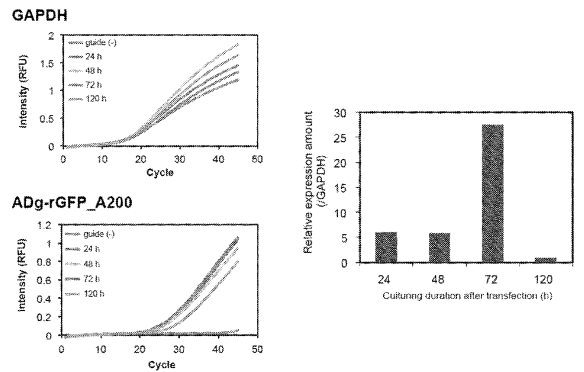
【図 30】



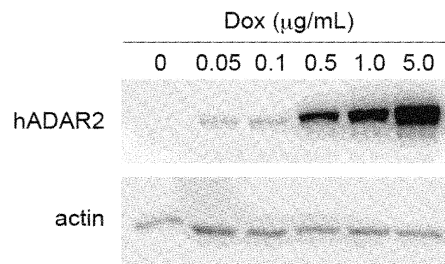
【図 31】



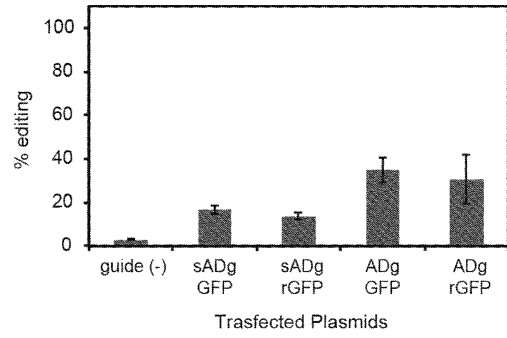
【図 32】



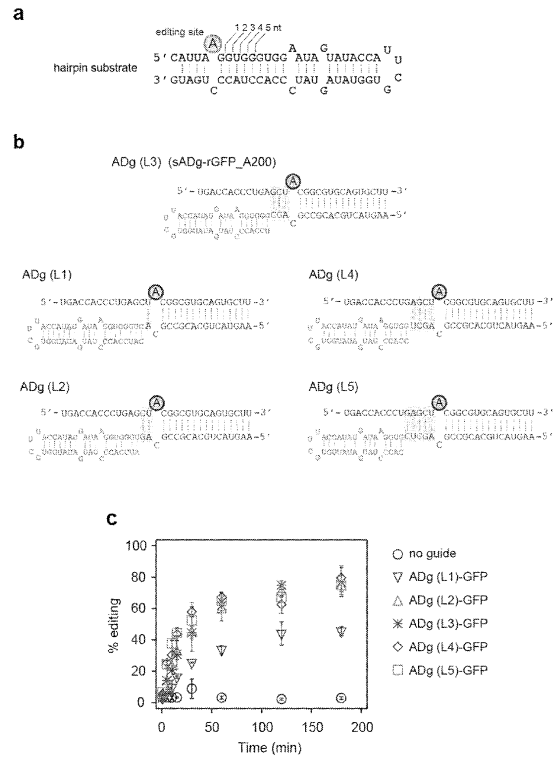
【図 33】



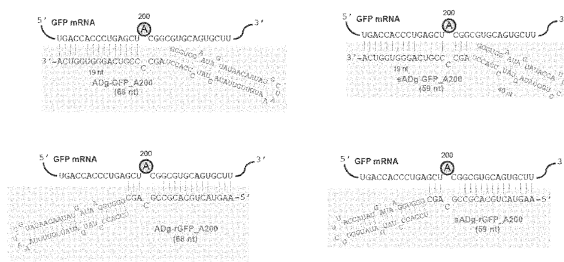
【図 3 4】



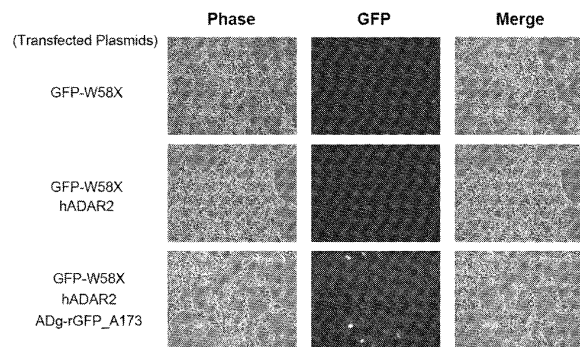
【図 3 5】



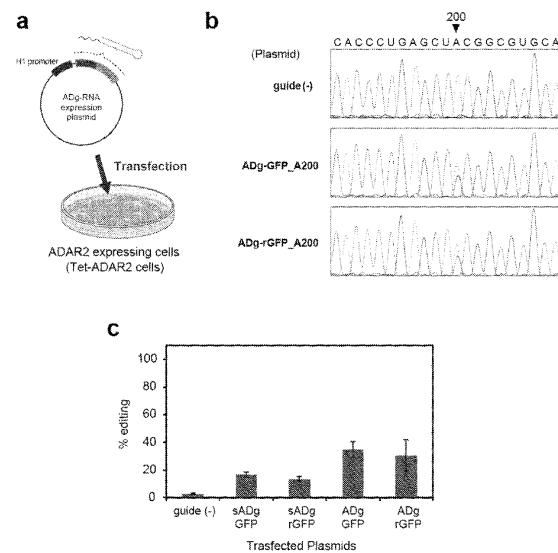
【図 3 6】



【図 3 8】



【図 3 7】



【配列表】

0006624743000001.app

---

フロントページの続き

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第2016/097212 (WO, A1)

ACS Chem. Biol., 2006年, vol.1, no.12, p.761-765

Science (1994) vol.266, issue 5191, p.1709-1713

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2012年, vol.51, issue 44, p.11166-11169

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2014年, vol.53, issue 24, p.6267-6271

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2013年, vol.110, no.45, p.18285-18290

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

WPIDS/WPIX (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq